

**Ortsgerichtete Mutagenese der Benzophenonsynthese von**  
***Hypericum androsaemum***

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte**

**Dissertation**

**von Tim Klundt**

**aus Lich / Hessen**

**1. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues**

**2. Referent: Professor Dr. Thomas Hartmann**

**eingereicht am: 14.04.2008**

**mündliche Prüfung (Disputation) am: 23.06.2008**

**Druckjahr 2008**

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

Beerhues, L., Liu, B., Raeth, T., **Klundt, T.**, Beuerle, T., Bocola, M. (2007) Benzoic acid-specific type III polyketide synthases. *American Chemical Society Symposium Series* 955 (Rimando, A.M., Baerson, S.R., eds.): 97-108

Liu, B., Beuerle, T., **Klundt, T.**, Beerhues, L. (2004) Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* 218: 492-496

Gewidmet meiner Tante Bärbel Pistor (1940 – 2005)

## Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	4
1.1 Polyketidsynthasen.....	4
1.1.1 Chalkonsynthase.....	6
1.1.2 Benzophenonsynthase.....	6
1.1.3 Biphenylsynthase.....	8
1.1.4 Stilbensynthase.....	9
1.1.5 Valerophenonsynthase.....	10
1.1.6 Acridonsynthase.....	10
1.1.7 2-Pyronsynthase.....	11
1.1.8 Benzalacetonsynthase.....	12
1.1.9 Phlorisobutyrophenonsynthase.....	13
1.1.10 Aktives Zentrum von Typ III PKS.....	13
1.2 <i>Hypericum androsaemum</i> .....	15
1.3 Zielsetzung.....	16
1.4 Modellierung.....	16
1.5 Punktmutation.....	17
2. Material.....	18
2.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer.....	18
2.1.1 Nährmedien.....	19
2.1.2 Lösungen für biochemische Untersuchungen.....	19
2.1.2.1 Puffer zur Extraktion und Enzyminkubation.....	19
2.1.2.2 Puffer zur Enzymreinigung.....	19
2.1.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes.....	20
2.1.2.4 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese (PAGE).....	21
2.1.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie.....	22
2.1.3.1 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	22
2.1.3.2 Lösung für die Induktion.....	22
2.1.3.3 Antibiotika.....	22
2.1.3.4 Puffer für den Zellaufschluss mit Lysozym.....	23
2.1.3.5 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese.....	23
2.1.3.6 Puffer für die Plasmidisolierung.....	23
2.1.3.7 Puffer für die Reinigung von Proteinen über Ni-NTA-Agarose.....	24
2.1.4 Enzyme.....	25
2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide.....	25
2.1.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.1.5.2 Vektoren.....	25
2.1.6 Oligonukleotide.....	26
2.2 Geräte.....	35
3. Methoden.....	37
3.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	37
3.1.1 Instrumentierung.....	37
3.1.2 Fließmittel (mobile Phase).....	37
3.2 Analytik mittels gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).....	38

3.2.1 GC-MS-Analytik.....	38
3.2.2 Instrumentierung.....	39
3.2.3 Probenbereitung.....	39
3.3 Fast protein liquid chromatography (FPLC).....	40
3.3.1 Affinitätschromatographie.....	40
3.3.1.1 Instrumentelle Aufreinigungsmethode von GST-Fusionsproteinen.....	40
3.3.1.2 Manuelle Aufreinigungsmethode von GST-Fusionsproteinen.....	41
3.3.1.3 Ni-NTA-Agarose (His-Trap-Aufreinigung).....	42
3.4 Radioscan-Analyse.....	43
3.5 Enzyminkubationen.....	43
3.5.1 Bestimmung von Proteingehalten.....	43
3.5.2 Polyketidsynthese-Ansätze.....	43
3.6 Charakterisierung überexprimierter Proteine.....	44
3.6.1 Bestimmung von pH- und Temperatur-Optima.....	44
3.6.2 Untersuchung der Substratspezifität.....	44
3.6.3 Bestimmung von kinetischen Daten.....	45
3.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.7.1 Herstellung des Gels und Probenvorbereitung.....	45
3.7.2 Elektrophorese und Detektion der Proteinbanden.....	46
3.7.3 Bestimmung des Molekulargewichts.....	46
3.8 Molekularbiologische Methoden.....	46
3.8.1 Anzucht und Kultivierung von E. coli.....	46
3.8.2 Lagerung von Bakterienkulturen.....	47
3.8.3 Messung der optischen Dichte (OD).....	47
3.8.4 Oligonukleotide.....	47
3.8.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	47
3.8.6 Fällung von DNA.....	48
3.9 Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction; PCR).....	48
3.9.1 Sequenziergel .....	51
3.9.2 Auswertung der Sequenzierdaten .....	51
3.10 Expression von GST-Fusionsproteinen und His-Tag-Proteinen.....	52
3.10.1 Expression .....	52
3.10.2 Zellaufschluss.....	52
3.11 Agarose-Gelelektrophorese.....	53
3.12 Transformation von Plasmid in E. coli.....	53
3.12.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	53
3.12.2 Transformation von E. coli mit Plasmid.....	54
3.12.3 Plasmidkontrolle.....	54
3.13 Plasmidisolation aus E. coli.....	55
3.13.1 Plasmid-Minipräparation.....	55
4. Ergebnisse.....	56
4.1 Detektion der Enzymaktivität der Wild-Typ-BPS .....	56
4.2 Ergebnisse der Homologie-Modellierung.....	61
4.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten von BPS-Mutanten.....	63
4.3.1 Einzelmutationen der BPS in Richtung CHS.....	63

4.3.2 Mehrfachmutationen der BPS in Richtung CHS.....	65
4.3.3 Einzelmutationen der BPS in Richtung ACS.....	67
4.3.4 Mehrfachmutationen der BPS in Richtung ACS.....	68
4.3.5 Einzelmutationen der BPS in Richtung 2-PS.....	69
4.3.6 Einzelmutationen der BPS in Richtung BIS.....	69
4.3.7 Mutationen der BPS auf Basis des Homologie-Modells.....	70
4.4 Abschließender Vergleich der Mutanten mit Wild-Typ.....	76
4.5 Charakterisierung des BPS Wild-Typs und der Mutante T135L.....	76
4.5.1 Spezifität.....	76
4.5.2 Temperatur- und pH-Abhängigkeit .....	78
4.5.3 Kinetische Parameter.....	79
4.6 Modellierung der BPS-Reaktionsintermediate.....	84
4.7 Rationalisierung der T135L-Mutante durch Modellierung.....	92
4.7.1 Postulierter Reaktionsmechanismus der Mutante.....	92
4.7.2 Modellierung von Mutante und Wild-Typ mit Benzoyl-CoA als Starter-Substrat.....	93
4.7.3 Modellierung von Mutante und Wild-Typ mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA als Starter.....	97
5. Diskussion.....	100
6. Zusammenfassung.....	113
7. Literaturverzeichnis.....	114
8. Anhang.....	120





## I. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
ACS	Acridonsynthase
AU	Area Unit, Flächeneinheit bei Peaks in HPLC-Chromatogrammen
BAS	Benzalacetonsynthase
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BIS	Biphenylsynthase
BPS	Benzophenonsynthase
BUS	Phlorisobutyrophenonsynthase
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
DAD	Photodioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Gaschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H.a.	<i>Hypericum androsaemum</i>
H.p.	<i>Hypericum perforatum</i>

HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
LB	Luria-Bertani
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zur Ladung
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKS	Polyketidsynthase
2-PS	2-Pyronsynthase
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SOC	Super Optimal Broth (Catabolic repression)
STS	Stilbensynthase
TAL	Triacetic acid lactone, Triacetat-Lakton, 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
UV	Ultraviolett
V	Volt

VPS Isovalerophenonsynthase

W Watt

### **Aminosäuren**

A=Ala Alanin

C=Cys Cystein

D=Asp Asparaginsäure

E=Glu Glutaminsäure

F=Phe Phenylalanin

G=Gly Glycin

H=His Histidin

I=Ile Isoleucin

K=Lys Lysin

L=Leu Leucin

M=Met Methionin

N=Asn Asparagin

P=Pro Prolin

Q=Gln Glutamin

R=Arg Arginin

S=Ser Serin

T=Thr Threonin

V=Val Valin

W=Trp Tryptophan

Y=Tyr Tyrosin

# 1. Einleitung

In dieser Arbeit werden Untersuchungen zu dem Enzym Benzophenonsynthase (BPS) durchgeführt. Die BPS ist eine Polyketidsynthase (PKS) des Typs III und wurde erst kürzlich zum ersten Mal aus *Hypericum androsaemum* kloniert (Liu et al., 2003). In den letzten Jahren konnte die Kristallstruktur einiger schon länger bekannter Typ III PKS aufgeklärt werden, woraus Erkenntnisse zu den spezifitätbestimmenden Aminosäuren resultieren. Die BPS ist außergewöhnlich, da sie das seltene Starter-Substrat Benzoyl-CoA verwendet (Moore und Hertweck, 2002). Durch die Kombination biochemischer, molekulargenetischer und computergestützter Versuche in dieser Arbeit werden Struktur-Funktions-Beziehungen in der BPS untersucht. Darüber hinaus gibt es Bestrebungen, die Substrat- und Produktspezifität des Enzyms zu modifizieren.

## 1.1 Polyketidsynthasen

Polyketidsynthasen (PKS) sind Enzyme, also katalytisch aktive Moleküle, aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen, die eine Reihe von pharmakologisch interessanten Sekundärstoffen synthetisieren. Das Charakteristikum der Sekundärstoffe ist die Spezifität. Viele Antibiotika, Immunsuppressiva und auch einige Antimykotika gehören zu dieser Gruppe. Obwohl Polyketidsynthasen untereinander stark in ihrer Masse und Struktur variieren, ist ihr chemischer Reaktionsmechanismus der gleiche: Die Verknüpfung von C<sub>2</sub>-Einheiten, sogenannten Acetyl-Gruppen, führt zu Poly-β-Keto-Verbindungen, auch Polyketide genannt. Polyketidsynthasen lassen sich in drei Gruppen untergliedern: PKS I, PKS II und PKS III (Austin und Noel, 2003). Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich alle drei Enzymgruppen evolutiv aus der Fettsäure-Biosynthese entwickelten. Auch hier sind die Substrate und Zwischenprodukte stets mit Carrier-Molekülen verestert, entweder mit Coenzym A oder dem 9 kDa großen Acylcarrierprotein (ACP).

Der bekannteste Vertreter der PKS I ist die Erythromycin-Synthase, ein sehr großes Trimer aus jeweils 350 kDa mit mehreren Domänen. Charakteristisch ist der modulare Aufbau. Für jeden Schritt der Kettenverlängerung und Modifikation ist ein individuelles Modul verantwortlich.

Das hervorzuhebende Merkmal der PKS II ist, dass die Enzymaktivitäten mit distinkten Proteinen assoziiert sind. Der Enzymkomplex wird iterativ genutzt, um multiple Kondensationen durchzuführen. Phenolische Verbindungen sind die typischen Produkte.

Im Gegensatz zu PKS I und PKS II handelt es sich bei PKS III um kleine Enzyme (Homodimere, ca. 84 kDa). Sie besitzen ein einziges aktives Zentrum pro Untereinheit, an dem alle Katalyseschritte ablaufen: Decarboxylierung, Kondensation, Zyklisierung und häufig Aromatisierung. Untereinander lassen sie sich vor allem durch ihre Substrat- und Produktspezifität unterscheiden. Große Unterschiede gibt es in der Anzahl der angelagerten C<sub>2</sub>-Einheiten und dem Zyklisierungsmechanismus. Es wird vermutet, dass auch die PKS Typ III evolutiv von der Fettsäure-Biosynthese, genauer von der  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase abstammen.

Die bekannteste PKS III ist die Chalkonsynthase (CHS), weshalb der PKS-Typ III auch als CHS-verwandter Enzym-Typ bezeichnet wird. Die PKS III, die hier von Bedeutung sind, katalysieren die Kondensation von einem Starter-CoA-Ester mit Malonyl-CoA-Einheiten zu einem Polyketid. Anschließend erfolgt die Zyklisierung des Polyketid-Zwischenproduktes zu einem aromatischen Ring. Es gibt allerdings Ausnahmen: Die 2-Pyronsynthase (2-PS) beispielsweise akzeptiert neben ihrem Starter-Substrat nur zwei C<sub>2</sub>-Körper und lässt als Produkt ein Pyron entstehen. Seit kurzem ist bekannt, dass die drei Aminosäuren Cys 164, His 303 und Asn 336 im katalytischen Zentrum essenziell und auch in anderen PKS III hoch konserviert sind. Demzufolge kommen sie in allen Polyketidsynthasen Typ III vor (Austin und Noel, 2003). Die Nummerierung dieser Aminosäuren erfolgte an Hand des Enzyms, das zuerst kristallisiert wurde: CHS 2 von Luzerne (*Medicago sativa*) (Ferrer et al., 1999). Jede bisher bekannte homologe PKS III hat mit der CHS eine Sequenzidentität von mindestens 40%. Dies ließ sich von Ferrer et al. (1999) in Aminosäuresequenzvergleichen mit anderen Typ III PKS bisher in sämtlichen Untersuchungen belegen. Die in dieser Arbeit untersuchte Benzophenonsynthase (BPS) besitzt eine 59,1 %ige Identität auf Aminosäuresequenz-Ebene. Da die CHS in höheren Pflanzen ubiquitär vorkommt, kann davon ausgegangen werden, dass sich die anderen CHS-verwandten Enzyme von ihr evolutiv ableiten. Detaillierter vorgestellt werden nachfolgend die Chalkonsynthase, die Benzophenonsynthase, die Biphenylsynthase sowie einige andere Polyketidsynthasen Typ III, auf die sich die Forschung dieser Arbeit bezieht. Anschließend wird mit Hilfe eines Sequenzabgleichs genauer auf die Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser Enzyme eingegangen.

### 1.1.1 Chalkonsynthase

Die CHS, der Prototyp der PKS III, ist in allen Pflanzen zu finden. Sie katalysiert die Verknüpfung von einem *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Molekül mit drei Malonyl-CoA-Molekülen zu einem Tetraketid. Anschließend wird dieses Zwischenprodukt durch eine Claisen-Kondensation zu einem Naringenin-Chalkon zyklisiert (Abb. 1). Dies ist der Ausgangsstoff für viele Flavonoide, die in der Natur und in der Forschung eine große Bedeutung besitzen. Sie können antiviral, antiplasmodial, antimikrobiell und auch gegen Krebszellen wirken (Zhang et al., 2004; Iinuma et al., 1996).

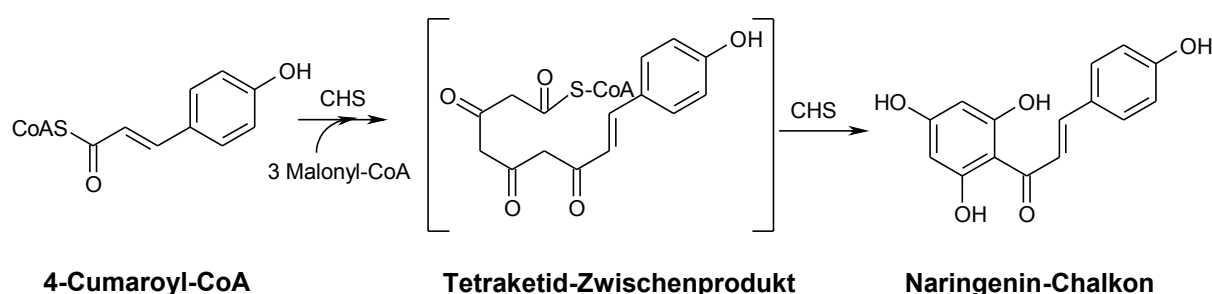


Abbildung 1: Reaktion der Chalkonsynthase

Die Chalkonsynthase ist nicht nur durch ihre Häufigkeit in der Natur für die Forschung wichtig, sie ist auch das Enzym, welches als erste Polyketidsynthase vom Typ III kristallisiert und röntgendiffraktometrisch vermessen wurde (Ferrer et al., 1999). Aus den Untersuchungen der Kristallstruktur wurden eine Vielzahl von Reaktionsinterpretationen anderer PKS III abgeleitet und analog begründet.

### 1.1.2 Benzophenonsynthase

Die Benzophenonsynthase stellt den Schwerpunkt dieser Arbeit dar, demzufolge wird sie ausführlicher beschrieben. Sie ist eine PKS des Typs III wie die oben vorgestellte CHS.

Die Benzophenonsynthase wurde das erste Mal in *Centaurium erythraea*-Zellkulturen (Gentianaceae) gefunden (Beerhues, 1996). Dort akzeptiert sie als Hauptsubstrat das 3-Hydroxybenzoyl-CoA und bildet nach einer dreifachen Kettenverlängerung mit Malonyl-CoA das Tetraketidzwischenprodukt. Nach anschließender Claisen-Kondensation bildet sich das 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon. Kloniert und charakterisiert wurde die Benzophenonsynthase zum ersten Mal aus *Hypericum androsaemum* (Liu et al., 2003). Sie ist ein

Homodimer mit einer molekularen Masse von jeweils 42,8 kDa. Das bevorzugte Substrat ist hier das Benzoyl-CoA. Nach dreifacher Elongation mit Malonyl-CoA entsteht das lineare Tetraketid. Es wird durch eine Claisen-Kondensation zum 2,4,6-Trihydroxybenzophenon, dem BPS-Hauptprodukt zyklisiert und aromatisiert (Abb. 2).

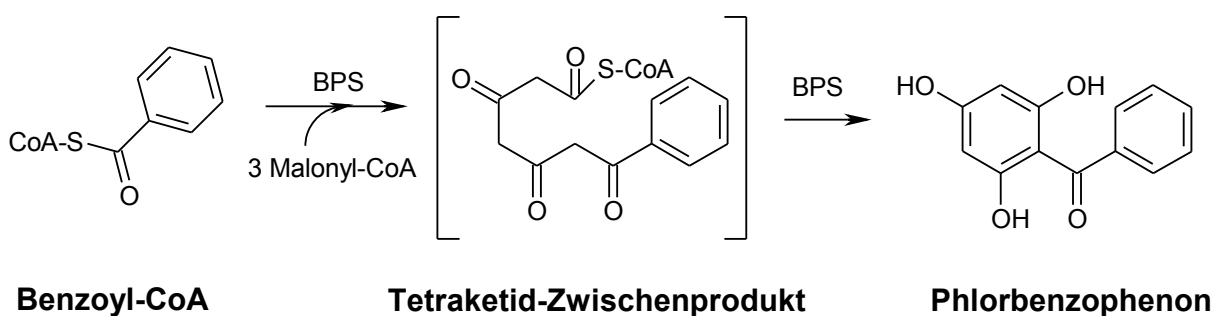


Abbildung 2: Reaktion der Benzophenonsynthase

Dieses Produkt kann durch eine Cytochrom P450-Monooxygenase in 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon überführt werden. Beide Verbindungen sind Ausgangsstoffe für eine Vielzahl pharmakologisch relevanter Substanzen (Abb. 3).

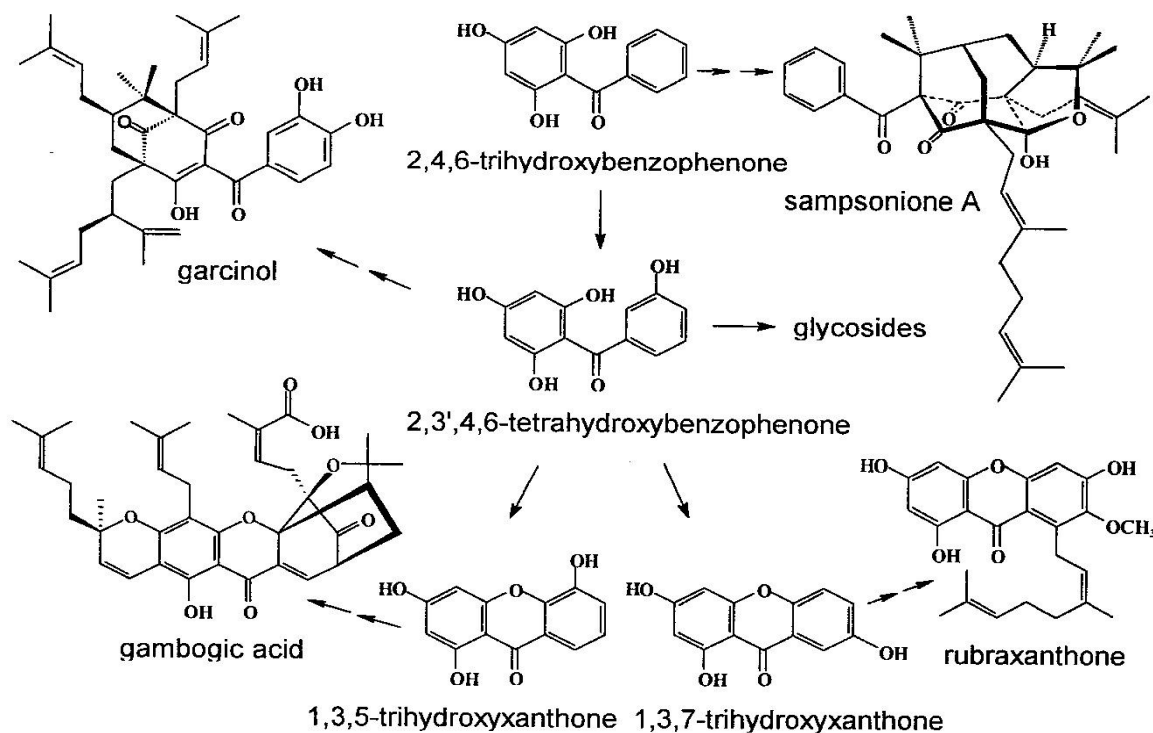


Abbildung 3: Pflanzeninhaltsstoffe, deren Grundkörper aus 2,4,6-Trihydroxybenzophenon entstehen

Als Beispiele sein hier genannt:

1. Garcinol, welches ein potenter Inhibitor der Histonacetyltransferase ist und Apoptose induziert (Balasubramanyam et al., 2004).
2. Sampsonion A, welches zytotoxisch wirkt und für die Therapie von Krebs in der Diskussion ist (Hu et al., 1999; Matsumoto et al., 2003).
3. Gamboginsäure, welche antitumoral aktiv ist und anders als Paclitaxel Apoptose unabhängig vom Zellzyklus induziert (Cuesta Rubio et al., 1999).
4. Rubraxanthon, dessen antibakterielle Wirkung gegen multiresistente Erreger mit der von Vancomycin vergleichbar ist (Fuller et al., 1999).

Die Wirkungsmechanismen und Targetstrukturen dieser mehrfach prenylierten polyzyklischen Benzophenon-Derivate werden zur Zeit intensiv untersucht (Hu et al., 1999; Matsumoto et al., 2003).

Weitere Verbindungen zeigen HIV-inhibitorische, plasmodiale und antioxydative Aktivitäten (Cuesta Rubio et al., 1999; Fuller et al., 1999).

Bei den Inkubationen der BPS mit Benzoyl-CoA wird *in vitro* ein Nebenprodukt in Form eines Laktons beobachtet (Liu et al., 2003). Es entsteht nach zweifacher Kettenverlängerung und anschließendem Lakton-Ringschluß (Abb. 4).

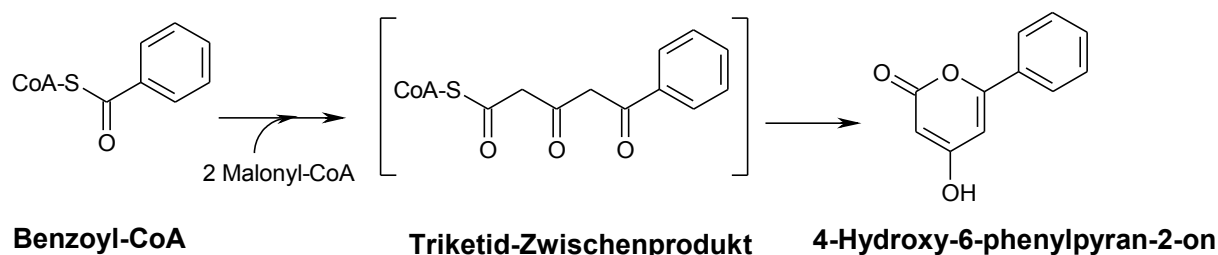


Abbildung 4: *In vitro* Entstehung des BPS-Nebenprodukts 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on

### 1.1.3 Biphenylsynthase

Die PKS III Biphenylsynthase wurde zum ersten Mal in *Sorbus aucuparia*-Zellkulturen entdeckt (Liu et al., 2004). Sie ist erwähnenswert, da sie wie die Benzophenonsynthase als



Startersubstrat das Benzoyl-CoA verwendet. Im Gegensatz zur Letzteren schließt sich nach der dreifachen Elongation mit Malonyl-CoA keine Claisen-Kondensation, sondern eine Aldol-Kondensation an (Abb.5). Bekannte Biphenyl-Derivate sind zum Beispiel das Aucuparin in *Sorbus aucuparia* (Eberesche) sowie das Malusfuran in *Malus domestica* (Apfel). Beide Stoffe sind bedeutende Phytoalexine unserer wirtschaftlich wichtigen Obstbäume und somit interessante Forschungssubstanzen (Kokubun und Harborne, 1994; Kokubun und Harborne, 1995).

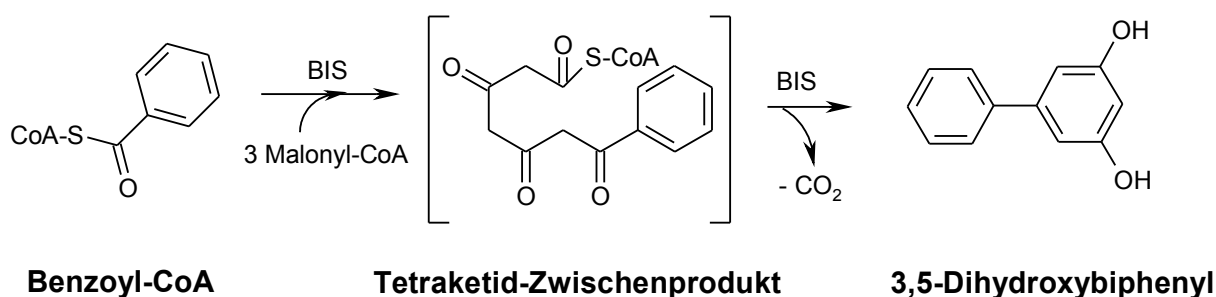


Abbildung 5: Reaktion der Biphenylsynthase

### 1.1.4 Stilbensynthase

Da bis heute neben der CHS und 2-PS nur noch die STS unter den pflanzlichen Typ III PKS kristallisiert und röntgendiffraktometrisch vermessen wurde, wird auch sie in dieser Arbeit kurz vorgestellt. Die Stilbensynthase ist ein Enzym, das zuerst aus Erdnusszellkulturen im Jahre 1984 gewonnen wurde (Schoppner et al., 1984). Kloniert wurde sie aus *Pinus sylvestris* (Schröder et al., 1988). Die Besonderheit ist, dass sie wie die CHS als Ausgangssubstrat *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA akzeptiert und mit drei Malonyl-CoA zu einem linearen Tetraketid verknüpft. Anschließend erfolgt eine Aldol-Kondensation, bei der als Endprodukt Resveratrol entsteht (Abb. 6). Zur Zeit wird dieses unter anderem auf die Funktion als Fungistatikum untersucht (Tropf et al., 1995). Es wird angenommen, dass das Resveratrol für das „Französische Paradoxon“ verantwortlich ist, nämlich die antiatheriosklerotische Wirksamkeit verschiedener Rotweine (Sielmann und Creasy, 1992).

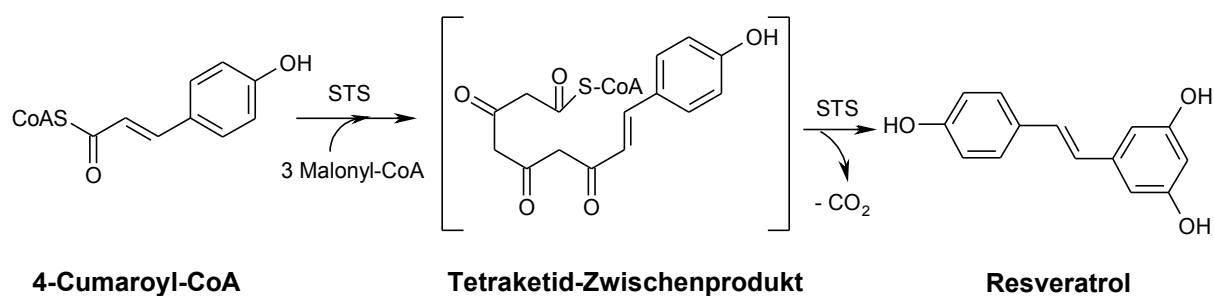


Abbildung 6: Reaktion der Stilbensynthese

### 1.1.5 Valerophenonsynthese

Die Valerophenonsynthese, genauer Phlorisovalerophenonsynthese genannt, ist ein Enzym, welches zum ersten Mal aus Hopfen (*Humulus lupulus*) kloniert wurde (Zuurbier et al., 1998). Als bevorzugtes Substrat akzeptiert es das Isovaleryl-CoA. Dieses wird mit drei Malonyl-CoA zu einem Tetraketidzwischenprodukt verknüpft. Nach einer Claisen-Kondensation entsteht Phlorisovalerophenon (Abb. 7). Aus ihm entstehen im Hopfen unter anderem die Hopfenbitterstoffe, zu denen Humulon und Lupulon zählen.

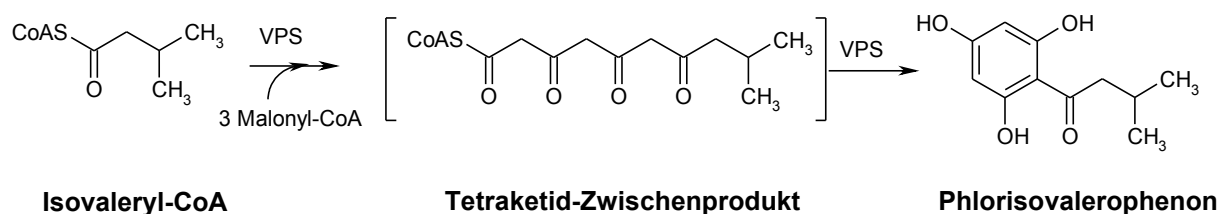


Abbildung 7: Reaktion der Valerophenonsynthese

### 1.1.6 Acridonsynthese

Eine weitere PKS Typ III ist die Acridonsynthese (ACS), die zum ersten Mal aus *Ruta graveolens* isoliert wurde (Baumert et al., 1994). Sie ist das entscheidende Enzym bei der Entstehung des Acridonalkaloid-Grundgerüsts, das für die Biosynthese von Phytoalexinen dieser Pflanzen benötigt wird. Da Acridonderivate mit der DNA-Synthese interagieren und

dadurch erhebliche Nebenwirkungen hervorrufen, werden sie in der Humanmedizin nicht angewendet.

Ausgangssubstrat für die ACS ist das N-Methylantraniloyl-CoA, welches in drei Stufen mit Malonyl-CoA zu einem Tetraketid verlängert wird. Anschließend erfolgen die Zyklisierung über eine Claisen-Kondensation und eine Stickstoffveretherung zum Acridon durch Wassereliminierung (Abb. 8).

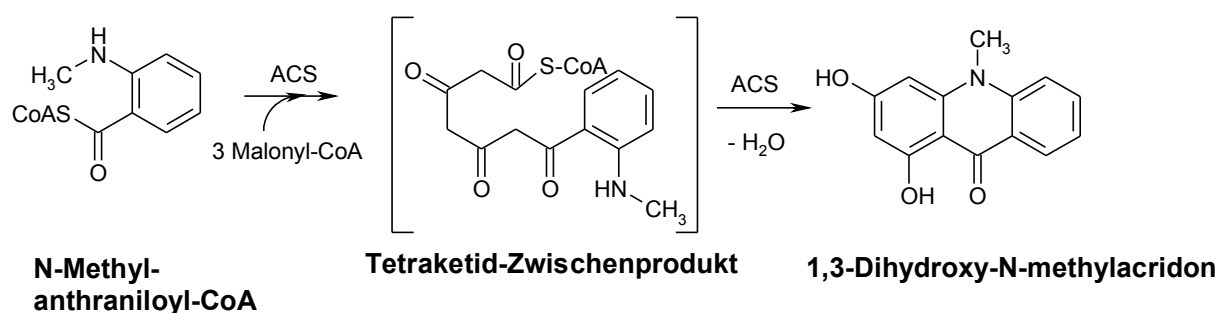


Abbildung 8: Reaktion der Acridonsynthase

Die ACS hat eine große Bedeutung für die Erforschung der BPS, da sie ein Substrat akzeptiert, das am Benzoylrest in *ortho*-Position eine N-Methylgruppe besitzt. Überlegungen gehen in die Richtung, die BPS durch Mutation so zu verändern, dass sie Substrate akzeptiert, welche in *ortho*-Position Substituenten tragen. (s. Kap. 4).

### 1.1.7 2-Pyronsynthase

Die 2-PS wurde das erste Mal aus *Gerbera hybrida* kloniert (Helariutta et al., 1995). Sie bildet eine der Ausnahmen in der großen Familie der PKS Typ III. Als physiologisches Substrat akzeptiert sie Acetyl-CoA und verlängert dieses mit Malonyl-CoA. Im Gegensatz zu den anderen PKS werden nur zwei C<sub>2</sub>-Einheiten angelagert, und die Reaktion bricht danach ab. Nach der Elongation entsteht ein Lakton, das 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyrone, welches auch Triacetat-Lakton (TAL) genannt wird (Abb. 9). TAL ist der Grundstoff für die Bildung von Gerberin, eines Wachstumshemmers für Bakterien und Pilze, welcher auch als Fraßschutz fungiert (Eckermann et al., 1998).

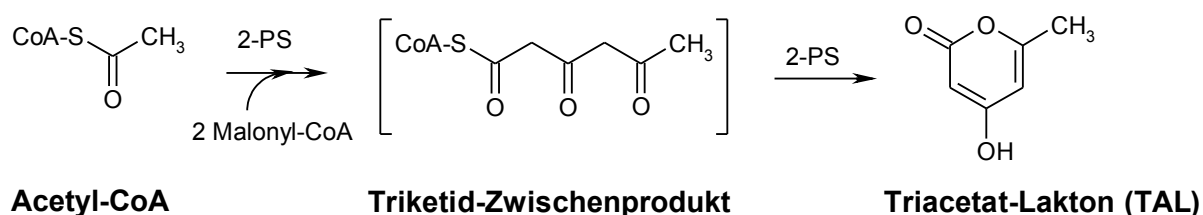


Abbildung 9: Reaktion der 2-Pyronsynthase

### 1.1.8 Benzalacetonsynthase

Die Benzalacetonsynthase (BAS) wurde zum ersten Mal in Himbeere und Rhabarber entdeckt und daraus isoliert (Borejsza-Wysocki und Hrazdina, 1996). Kloniert wurde sie aus Rhabarber von Abe et al. im Jahre 2001. Sie bildet das Ausgangsprodukt des typischen Aromastoffs der Himbeere, *p*-Hydroxyphenylbutan-2-on (*p*HPB). Die BAS katalysiert die Verknüpfung von einem Molekül *p*-Cumaroyl-CoA mit einem Molekül Malonyl-CoA unter Abspaltung eines CO<sub>2</sub> zum *p*-Hydroxyphenylbut-3-en-2-on (*p*-Hydroxybenzalacetone). Eine NADPH-abhängige Benzalacetone-reduktase hydriert die aliphatische Doppelbindung und lässt das *p*HPB entstehen (Abb. 10). Benzalacetone bildet auch einen Baustein des antipyretisch wirkenden Lindleyins (Abe et al., 2001).

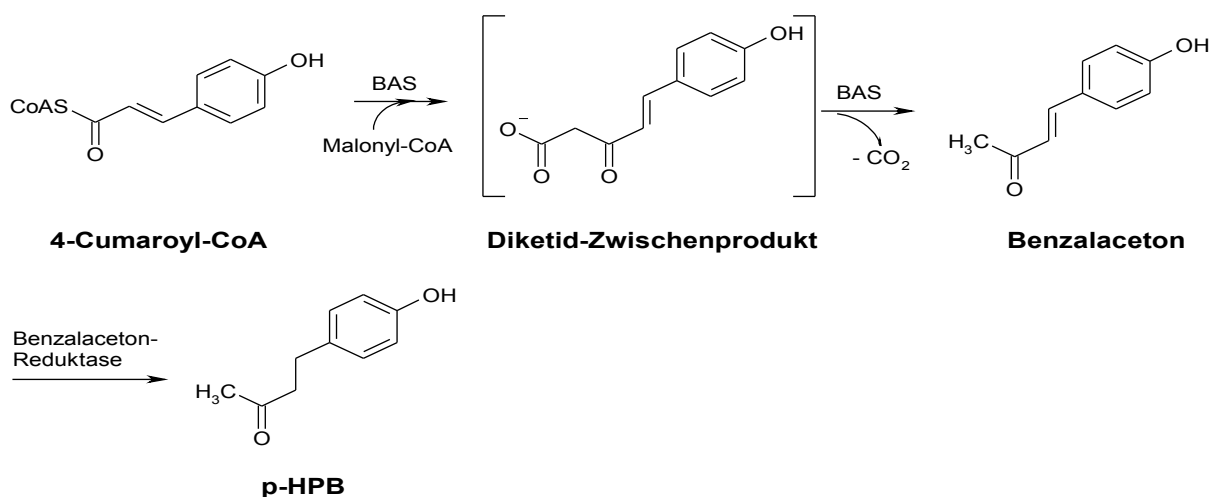


Abbildung 10: Reaktion der Benzalacetonsynthase sowie der Benzalacetone-Reduktase

### 1.1.9 Phlorisobutyrophenonsynthase

Eine weitere PKS Typ III aus *Hypericum spec.* ist neben der CHS und der BPS die in *Hypericum perforatum* (Johanniskraut) vorkommende Phlorisobutyrophenonsynthase (BUS). Für Forschungszwecke gibt es noch kein kloniertes Enzym, es wurde aber einwandfrei in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Klingauf, 2004, Klingauf et al., 2005). BUS bildet die Grundgerüst der in *H. perforatum* wichtigen Inhaltsstoffe Hyperforin und Adhyperforin. Diese wirken antidepressiv, so dass Johanniskraut-Extrakte bei leichten bis mittelschweren Formen von Depressionen eingesetzt werden (Schulz, 2003).

Das Grundgerüst des Hyperforins wird aus drei Molekülen Malonyl-CoA, sowie einem Molekül Isobutyryl-CoA gebildet. Zunächst entsteht ein lineares Tetraketid. Anschließend erfolgt eine Zyklisierung über eine Claisen-Kondensation, sowie eine Aromatisierung zum Endprodukt Phlorisobutyrophenon (Abb. 11).

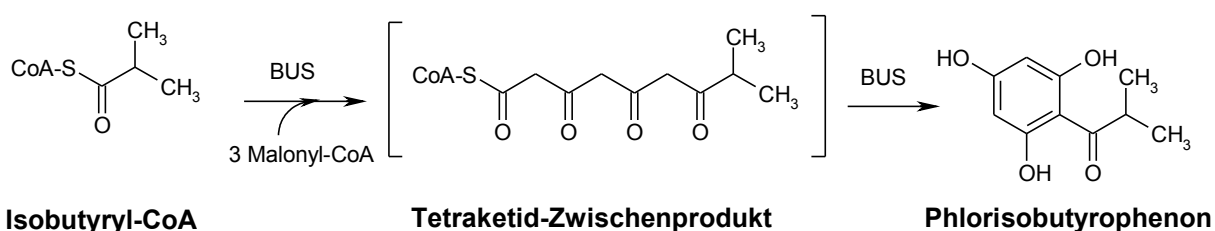


Abbildung 11: Reaktion der Phlorisobutyrophenonsynthase

### 1.1.10 Aktives Zentrum von Typ III PKS

Zum besseren Verständnis der Funktion einzelner Aminosäuren wurden die für diese Arbeit wichtigen PKS Typ III-Aminosäuresequenzen zu einem „Alignment“ zusammen gestellt (siehe Angang Abb. 61). Nach den bisherigen Strukturanalysen sind die folgenden Aminosäuren am Aufbau der katalytischen Tasche beteiligt:

Das aktive Zentrum einer typischen PKS III besitzt eine CoA-Bindungseinheit. Diese besteht aus Aminosäuren, die für die Fixierung der CoA-Einheit des Substrates verantwortlich sind, aber keinerlei Einfluß auf die Selektivität der unterschiedlichen CoA-Ester haben. Wichtiger sind laut den Untersuchungen von Jez et al. (2002) die Aminosäuren, die zur Substratspezifität beitragen. Dabei handelt es sich zunächst um die Aminosäuren Phenylalanin 215 und Tyrosin 265 (Zählweise nach CHS aus *M. sativa*). Außer in der Benzalacetonsynthase (BAS)

von *Rheum palmatum*, bei der sich in der Position 215 Leucin befindet, ist die Aminosäure Phenylalanin an dieser Position hoch konserviert, d. h. es befindet sich bei allen anderen pflanzlichen PKS Typ III immer ein Phenylalanin an dieser Stelle. Die Aminosäure an der Position 265 ist weniger konserviert. Die Benzophenonsynthese von *Hypericum androsaemum* und die Biphenylsynthese von *Sorbus aucuparia* besitzen dort anstelle von Phenylalanin ein Tyrosin und die Acridonsynthese (ACS) von *Ruta graveolens* ein Valin. Zusätzlich zu diesen zwei Aminosäuren besitzen noch drei weitere eine große Bedeutung (Ferrer et al., 1999). Sie werden zusammen mit dem Phenylalanin 265 als Initiationstasche bezeichnet. Diese beinhaltet das dem Phenylalanin 215 direkt benachbarte Leucin 214 sowie die beiden Aminosäuren Isoleucin 254 und Glycin 256. Isoleucin 254 kommt in vielen pflanzlichen PKS Typ III vor und ist hoch konserviert. Die 2-Pyronsynthese (2-PS) von *Gerbera hybrida* sowie die BIS bilden hierbei Ausnahmen. 2-PS besitzt an der Stelle ein Methionin, die BIS ein Valin. Glycin 256 kommt in fast allen PKS Typ III vor. Ausnahmen in pflanzlichen PKS Typ III bilden beispielsweise die 2-PS (Leucin an Position 256), die Benzophenonsynthese (BPS) von *Hypericum androsaemum* und die Biphenylsynthese von *Sorbus aucuparia* mit jeweils einem Alanin. Zusätzlich zur Initiation des Reaktionsablaufes fanden Ferrer et al. (1999) heraus, dass es noch zwei weitere Bereiche gibt, die essenziell für die Funktion von PKS Typ III sind: Die katalytische Triade und die Elongationstasche. Der Name katalytische Triade leitet sich von den drei Aminosäuren ab, die in jeder Polyketidsynthese Typ III an hoch konservierten Positionen liegen. Sie katalysiert laut Ferrer et al. (1999) die Verknüpfung mit C<sub>2</sub>-Einheiten aus Malonyl-CoA, und sie umfaßt Cystein 164, Histidin 303 und Asparagin 336. Des Weiteren besteht das aktive Zentrum aus einer Elongationstasche. Sie besteht aus 8 verschiedenen Aminosäuren, die sowohl für die Kettenverlängerung (Elongation) als auch für die abschließende Faltung und Entstehung des Produkts verantwortlich sind. An der Position 132 besitzt die Chalkonsynthese ein Threonin. Davon abweichend enthält die Acridonsynthese (ACS) von *Ruta graveolens* ein Serin, die Valerophenonsynthese (VPS) von *Humulus lupulus* ein Glycin, die Biphenylsynthese von *Sorbus aucuparia* ein Alanin sowie die Benzalacetonsynthese von *Rheum palmatum* ein Leucin an dieser Position. Die Chalkonsynthese besitzt an Position 133 die Aminosäure Serin. In dieser Position gibt es einige Unterschiede zu anderen PKS Typ III. So ist in der 2-Pyronsynthese von *Gerbera hybrida* ein Alanin vorhanden. Die Stilbensynthese (STS) von *Pinus sylvestris* besitzt ein Threonin an dieser Position, die Acridonsynthese (ACS) von *Ruta graveolens* ein Alanin genauso wie die Benzalacetonsynthese (BAS) von *Rheum palmatum*. Die Position 194 ist bei vielen pflanzlichen PKS Typ III mit der Aminosäure Threonin besetzt. Im Gegensatz dazu variiert die Position 196 bei den PKS Typ III erheblich.

Besitzt die Chalkonsynthase von *Medicago sativa* dort ein Valin, so ist bei den meisten Enzymen eine andere Aminosäure zu finden: in 2-PS ein Isoleucin, in ACS ein Prolin, in BPS ein Methionin, in VPS ein Cystein und in BAS ein Threonin. An der Position 197 besitzt die CHS ein Threonin. Bei der 2-PS befindet sich dort ein Leucin, VPS besitzt an dieser Stelle ein Isoleucin, BIS ein Phenylalanin und BAS ein Cystein. An der Position 216 unterscheiden sich nur drei Enzyme von der CHS. An der Stelle, wo sich bei der CHS ein Glycin befindet, besitzt die BPS ein Serin, die ACS und BIS jeweils ein Alanin. Die Position 263 ist bei der CHS mit Leucin besetzt. Nur die BPS mit Methionin und die BIS mit Phenylalanin weichen davon ab. Die letzte Aminosäure der Elongationstasche in der CHS ist an Position 338 ein Serin. BPS und BIS haben an dieser Stelle ein Glycin und 2-PS ein Isoleucin. Abschließend kann festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchte Benzophenonsynthase aus *Hypericum androsaemum* eine hohe Homologie zu den bereits bekannten PKS Typ III aufweist.

## 1.2 *Hypericum androsaemum*

*H. androsaemum* gehört zu der selben Gattung wie *H. perforatum* aus der Familie Clusiaceae (früher Hypericaceae). Als Arzneipflanze spielt sie in Mitteleuropa eine unbedeutende Rolle. In mediterranen Ländern, wie Spanien und Portugal, ist sie als Heilpflanze anerkannt und wird dort eingehender untersucht. Eingesetzt wird *H. androsaemum* vor allem als Tee zur Diurese und als Cholagogum (Costa, 1994). Aktuelle Untersuchungen beziehen sich mehr auf die Inhaltsstoffe als auf deren Pharmakologie. Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Sesquiterpenen (> 40) im ätherischen Öl enthalten sind (Morteza-Semnani und Saeedi, 2005). Unterschieden werden muss zum einen zwischen den Blättern, in denen besonders Caryophyllenoxid (35,8 %), Ishwarane (30,5 %) und Humulenoxid II (5,6 %) vorkommen, und zum anderen den Blüten, in denen  $\alpha$ -Guaiene (40,2 %) und Caryophyllenoxid (28,0 %) den Hauptanteil ausmachen. Im Jahr 2002 gelang Valentão et al. die Identifizierung von neun Phenolderivaten (v.a. Quercetin-Derivaten) sowie sechs Phloroglucinolen. Erstere sind zu einem Anteil von 1,1 – 3,9 % in der Pflanze enthalten. Typisch ist das Vorhandensein von Xanthonderivaten. Die meisten gehören zum Typ der Hydroxy- bzw. Methoxyxanthone. Besonders hervorzuheben sind hierbei folgende Xanthone: 2-Hydroxy-5-methoxyxanthon, 3-Hydroxy-2,5-dimethoxyxanthon, 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon, Toxyloxanthon und Kielcorin (Nielsen und Arends, 1978). Ein Test zur Anwendung gegen Peroxylradikale als Antioxidanz war *in vitro* positiv, was aus der Fülle der Polyphenole und Flavonoide zu erklären ist (Valentão et al., 2002). Neueste Forschungen auf diesem Gebiet bei Maus-Leberzellen *in vivo*

haben aber eine Steigerung der Toxizität der Radikale bei gleichzeitiger kontinuierlicher Verabreichung von *H. androsaemum* gezeigt (Valentão et al., 2004). Die Frage, ob *H. androsaemum* als Arzneipflanze einzusetzen ist, bleibt somit bis jetzt ungeklärt.

### 1.3 Zielsetzung

An der Entstehung des wichtigen Inhaltsstoffs von *Hypericum perforatum*, Hyperforin bzw. Adhyperforin, ist eine Polyketidsynthase Typ III beteiligt (Klingauf, 2004; Klingauf et al., 2005). Bisher ist es allerdings nicht gelungen, eine aktive Isobutyrophenonsynthase aus *H. perforatum* zu klonieren. Die bekannten PKS Typ III aus *Hypericum spec.* sind die in *E. coli* aktive Chalkonsynthase und Benzophenonsynthase von *H. androsaemum* (Liu et al., 2003) sowie die Chalkonsynthase und die inaktive Benzophenonsynthase von *H. perforatum* (Klingauf, 2004). Die Untersuchungen begannen an der PKS Typ III von *Hypericum androsaemum*, da zu Beginn dieser Arbeit noch keine PKS aus *H. perforatum* vorlag. Die Arbeit soll Informationen über den katalytischen Reaktionsablauf im aktiven Zentrum von Polyketidsynthasen im Allgemeinen und der Benzophenonsynthase im Speziellen liefern. Durch die Kristallisierung und röntgendiffraktometrische Untersuchung der Chalkonsynthase aus Luzerne (*Medicago sativa*), die 4-Cumaroyl-CoA als Starter bevorzugt, wurden bereits wichtige Erkenntnisse zum Reaktionsmechanismus gewonnen (Ferrer et al., 1999). Allerdings ist über die unterschiedliche Substratspezifität, vor allem in Bezug auf aromatische CoAs, bis heute nur wenig bekannt. Die Benzophenonsynthase akzeptiert Benzoyl-CoA und 3-OH-Benzoyl-CoA. Mit 2-OH-Benzoyl-CoA und 4-OH-Benzoyl-CoA zeigt sie keine Aktivität. Ansätze, dies zu begründen, gehen in zwei Richtungen. Das Enzym wird kristallisiert und anschließend mittels Röntgenstrukturanalyse vermessen, oder es wird, wie im vorliegenden Fall ein Computermodell mittels „homology modelling“ entworfen und begleitend die zielgerichtete Mutation angewendet.

### 1.4 Modellierung

Bei der Modellierung wird ein strukturelles Bild eines zu untersuchenden Enzyms erhalten. Ein Enzym mit bekannter Struktur und möglichst hoher Aminosäuresequenzidentität zum bearbeiteten Enzym wird aus einer Strukturdatenbank, der pdb (protein-data-bank), gesucht. Anschließend werden die Aminosäuresequenzen der beiden Enzyme mittels Computer



(Swiss-modell, Swiss-pdb-viewer) abgeglichen, und ein theoretisches Strukturmodell wird berechnet. Durch Vergleiche des aktiven Zentrums zwischen bekanntem und unbekanntem Enzym lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion von bestimmten Resten ziehen. Ausgehend von dem Strukturmodell des Wild-Typs der BPS werden dann verschiedene Punktmutationen modelliert. Dabei wird die Substratbindung durch Zuhilfenahme des Programms Moloc molekuldynamisch berechnet. Es ist möglich, einzelne Reaktionsschritte im aktiven Zentrum bildlich darzustellen. Diese Arbeiten am Computer wurden freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Dr. M. Bocola vom Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim/Ruhr durchgeführt. So können Rückschlüsse gezogen werden, welche Aminosäuren für die Katalyse des Reaktionsablaufs verantwortlich sein können, und wie sie sich am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligen.

Beweise für die Richtigkeit können erbracht werden, indem die aus dem Modell vorhergesagten Aminosäuren, welche an der Substratbindung beteiligt sein können, durch Punktmutationen verändert werden, um eine Änderung der Substrat- beziehungsweise Produktspezifität zu erhalten. Diese experimentellen Änderungen der Substratbindung und -umsetzung können dann das Strukturmodell in seiner Aussagekraft stützen.

## 1.5 Punktmutation

Punktmutation ist der Austausch einer einzelnen Aminosäure in einer Aminosäuresequenz eines Proteins. Die Durchführung erfolgt mittels spezifischer, gezielt veränderter Primer und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zunächst ist es wichtig, eine zu verändernde Aminosäure in der Aminosäuresequenz des Proteins zu wählen. Dabei wird das vom Computer erzeugte Modell berücksichtigt. Anschließend muss das kodierende Triplet dieser Aminosäure in der cDNA des Enzyms gesucht werden. Es werden Primer-Paare erstellt, die zum einen relativ lang sind, um spezifisch an die gewünschte Stelle zu binden, an der die Mutation stattfinden soll. Zum anderen enthalten sie das für die neue Aminosäure kodierende Triplet. Praktisch wird der Austausch mit dem *QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene durchgeführt. Die entsprechenden Primer werden in Kapitel 2.1.6 aufgeführt, die veränderte Nukleotidsequenz ist unterstrichen.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer

Tabelle 1: Biochemische und molekularbiologische Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Agar-Agar	Roth
Benzoyl-CoA	Sigma Aldrich
Malonyl-CoA Lithiumsalz	Sigma Aldrich
[2- <sup>14</sup> C] Malonyl-CoA	Amersham Biosciences
Phlorbenzophenon	ICN
Select Yeast Extract	Life Technologies
Select Peptone	Life Technologies
IPTG	Sigma Aldrich
Agarose NEEO Ultra	Roth
Glutathion	Roth
Acrylamid	Gibco-BRL
Bis-Acrylamid	Gibco-BRL
TEMED	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
SDS	Roth
Tris	Biosolve Ltd.
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Kaliumchlorid	Roth
Coomassie®	Serva
Orthophosphorsäure	Roth
Salzsäure	Riedel de Haën
Kaliumhydroxid	Fluka
Glycerol	Roth
β-Mercaptoethanol	Fluka
Bromphenolblau	Aldrich
Methanol	Fisher-Scientific
Essigsäure	Roth

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ampicillin	Roth
Chloramphenicol	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Imidazol	Roth
RNAse A	Fermentas
Eisessig	Roth
Kaliumacetat	Fluka
Formamid	Sigma Aldrich

Alle Chemikalien sind von HPLC-Qualität oder p.A.

### 2.1.1 Nährmedien

### 2.1.2 Lösungen für biochemische Untersuchungen

#### 2.1.2.1 Puffer zur Extraktion und Enzyminkubation

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Herstellung und Lagerung</b>
Extraktionspuffer 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat- puffer pH 7 – 7,5	Kaliumdihydrogenphosphat 1,36 g Reinstwasser ad 100 ml	pH mit KOH einstellen, bei 4 °C lagern

#### 2.1.2.2 Puffer zur Enzymreinigung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Herstellung und Lagerung</b>
Elutionspuffer (Puffer B)	50 mM Tris-HCl 10 mM Glutathion (red.)	pH auf 8,0 einstellen, bei 4 °C lagern
PBS-Puffer (Puffer 4)	NaCl 4,09 g KCl 0,10 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,89 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,12 g Reinstwasser ad 500 ml	Kühl lagern
Waschpuffer (Puffer 2) 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat- puffer pH 7 – 7,5	Kaliumdihydrogenphosphat 1,36 g Reinstwasser ad 100 ml	pH mit KOH einstellen, bei 4 °C lagern

**2.1.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Herstellung und Lagerung</b>
Bradford Lösung	Coomassie®-Brilliant blue G-250 100 g Ethanol 96 % 50 ml Orthophosphorsäure 100 ml Reinstwasser ad 1000ml	Coomassie® in Ethanol lösen, Phosphorsäure zugeben und mit Wasser auf 1 l auffüllen. Bei 4 °C lagern

### 2.1.2.4 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese (PAGE)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Sammelgel	Reinstwasser 3,00 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 1,30 ml Acrylamid/Bis 30 % 0,65 ml 10 % (w/v) SDS 0,05 ml 10 % (w/v) APS 0,10 ml TEMED 5 µl	
Trenngel (12 %)	Reinstwasser 3,30 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 2,50 ml Acrylamid/Bis 30 % 4,00 ml 10 % (w/v) SDS 0,05 ml 10 % (w/v) APS 0,10 ml TEMED 5 µl	
Probenpuffer	Reinstwasser 2,70 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 1,00 ml Glycerin 2,00 ml 10 % (w/v) SDS 3,30 ml β-Mercaptoethanol 0,50 ml 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 0,50 ml	Bei 4 °C lagern
10x Laufpuffer	Tris 15 g Glycin 72 g Na-SDS 5 g Reinstwasser ad 500 ml	Bei 4 °C lagern, vor Gebrauch 1:10 verdünnen
Färbelösung	Coomassie®-blue R-250 Stammlösung 25 ml Methanol 100 ml Essigsäure 20 ml Reinstwasser ad 200 ml	
Coomassie®-blue R-250 Stammlösung	Coomassie®-blue R-250 0,50 g Reinstwasser 50 ml	Coomassie®-blue R-250 in Wasser lösen und anschließend filtrieren
Entfärber	Methanol 30 ml Essigsäure 20 ml Reinstwasser ad 200 ml	

## 2.1.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie

### 2.1.3.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
LB-Medium	Bacto-Pepton 10 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl 10 g Reinstwasser ad 1000 ml	Auf pH 7 einstellen, anschließend autoklavieren
SOC Medium	Bacto-Pepton 5 g Yeast-Extrakt 0,5 g 1 M NaCl 1,0 ml 1 M KCl 0,25 ml 2 M Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung 1,0 ml 2 M Glucose 1,0 ml Reinstwasser ad 100 ml	In 97 ml Reinstwasser lösen, autoklavieren und abkühlen lassen. Anschließend wird hinzu gegeben: Lagerung bei -20 °C
2 M Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 20,33 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 24,65 g Reinstwasser ad 100 ml	sterilfiltrieren

### 2.1.3.2 Lösung für die Induktion

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
0,5 M IPTG Lösung	IPTG 6 g Reinstwasser ad 500 ml	sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern

### 2.1.3.3 Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Ampicillin	Ampicillin 100 mg Reinstwasser ad 1 ml	sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern
Chloramphenicol	Chloramphenicol 30 mg Ethanol 100 % ad 1 ml	Bei -20 °C lagern

### 2.1.3.4 Puffer für den Zellaufschluss mit Lysozym

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Aufschlusspuffer	Tris-HCl 20 mM	pH auf 7,8 einstellen, immer frisch herstellen

### 2.1.3.5 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
50x TAE	Tris 2 M EDTA 0,05 M	mit Eisessig auf pH 8 einstellen
TBE-Puffer (für Sequenziergele)	Tris 90 mM Borsäure 90 mM EDTA 2 mM	
Ladepuffer (zum Sequenzieren)	25 mM EDTA 1,0 ml Formamid 5,0 ml Dextranblau 0,1 mg	Formamid mit Harz trocknen
Sequenziergel	Harnstoff 9 g 10x TBE-Puffer 3,0 ml Reinstwasser 11,5 ml 30 % Acrylamid 3,75 ml TEMED 0,01 ml 10 % (w/v) APS 230 µl	

### 2.1.3.6 Puffer für die Plasmidisolierung

Die Puffer für die Plasmidisolierung wurden nach der Anweisung des QIAGEN Plasmid Purification Handbook 11/98 hergestellt.

#### Puffer 1 (P1):

Zusammensetzung:

6,06 g Tris-Base, 3,72 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  werden in 800 ml Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 0,1 M HCl auf 8,0 eingestellt. Anschließend wird mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt. Vor Gebrauch wird zu 1 ml dieser Lösung 1 µl RNase A zugegeben.

Puffer 2 (P2):

Zusammensetzung:

8,0 g NaOH-Plättchen werden in 950 ml Reinstwasser gelöst.

Anschließend werden 50 ml einer 20 %igen SDS-Lösung hinzu gegeben, so dass das Endvolumen 1 l beträgt.

Puffer 3 (P3):

Zusammensetzung:

294,5 g Kaliumacetat werden in 500 ml Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Eisessig auf 5,5 eingestellt. Anschließend wird mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt.

**2.1.3.7 Puffer für die Reinigung von Proteinen über Ni-NTA-Agarose**Lysis-Puffer pH 8:

1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 3,5 g NaCl werden in 100 ml Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 5 N NaOH auf 8,0 eingestellt. Anschließend wird mit Reinstwasser auf 200 ml aufgefüllt.

Waschpuffer pH 8:

68,1 mg Imidazol werden in 50 ml Lysis-Puffer gelöst.

Elutionspuffer pH 8:

817 mg Imidazol werden in 50 ml Lysis-Puffer gelöst.



## 2.1.4 Enzyme

<b><u>DNA-Synthese für Mutationen</u></b>	
<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
<b><u>DNA-Synthese für Sequenzierung</u></b>	
<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Taq-DNA-Polymerase	Stratagene
<b><u>Restriktion</u></b>	
<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Kpn I	Life Technologies
Dpn I	Life Technologies
<b><u>Weiteres Enzym</u></b>	
<b>Enzym</b>	
RNAse A	

## 2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

### 2.1.5.1 *Escherichia coli*

#### K12<sup>®</sup>DH 5 $\alpha$

relevante Eigenschaften:

F $\phi$ 80 $\delta$ lacZ $\Delta$ M15 end A1 hsdR17(rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>) supE44 thi-1  $\lambda$ <sup>-</sup>gyrA96 relA1  $\Delta$ (lacZYA-argFV169) deoR

#### BL 21

relevante Eigenschaften:

F<sup>-</sup>, ompT, hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm

### 2.1.5.2 Vektoren

p-GEX-G: selbst erstellt (Schmidt, 1997)

pRSet-B-Vektor: (Invitrogen)

### 2.1.6 Oligonukleotide

#### Sequenzierprimer:

Für den Bereich der Basen 405 und 408 in der cDNA der BPS wurde der Primer „pGEX forw.“ verwendet, mit der Basensequenz:

5'-ATAGCATGGCCTTTGCAGG-3'

Der Bereich der Basen 591-657 wurde mit dem Primer „BPS 2 forw.“ sequenziert. Dieser besaß die Basensequenz:

5'-CTCAACCGCACCGTCAGGC-3'

Für den Basenbereich von 774-1131 wurde mit dem Primer „pGEX rev.“ sequenziert:

5'-GAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

#### Mutationsprimer:

Das unterstrichene Basentriplett zeigt die zur cDNA der Wild-Typ-BPS veränderte Stelle an. Das Triplett ist jeweils so gewählt worden, dass sich möglichst nur ein oder zwei Basen im Vergleich zur Wild-Typ-BPS cDNA unterscheiden, was allerdings nicht immer gegeben war.

BPS T135A sense:

5'-CACACGTGGTGTTCGCGACGGCCTCCGGGTTCATGATGCCC-3'

BPS T135A anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGGCCGTCGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135F sense:

5'-CACACGTGGTGTTCGCGACGTTCCCGGGTTCATGATGCCC-3'

BPS T135F anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGAACCGTCGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135G sense:

5'-CACACGTGGTGTTCGCGACGGGCTCCGGGTTCATGATGCCC-3'

BPS T135G anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGGCCCGTGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135I sense:

5'-CACACGTGGTGTTCGCGACGATCTCCGGGTTTCATGATGCCC-3'

BPS T135I anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGGATCGTGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135L sense:

5'-CACACGTGGGTGTTCGCGACGCTCTCCGGGTTTCATGATGCCC-3'

BPS T135L anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGGAGCGTGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135N sense:

5'-ACACGTGGTGTTCGCGACGAACTCCGGGTTTCATGATGCCCCG-3'

BPS T135N anti:

5'-GGCATCATGAACCCGGAGTTTCGTGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135S sense:

5'-CACACGTGGTGTTCGCGACGTCCTCCGGGTTTCATGATGCCC-3'

BPS T135S anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGGGACGTGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135S/S136A sense:

5'-ACGTGGTGTTCGCGACGTCCGCCGGGTTTCATGATGCCCCGGG-3'

BPS T135S/S136A anti:

5'-CCCGGGCATCATGAACCCGGCGGACGTGCGAACACCACG-3'

BPS T135V sense:

5'-CACACGTGGTGTTCGCGACGGCTCTCGGGTTTCATGATGCCC-3'

BPS T135V anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGGACCGTCGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS T135Y sense:

5'-CACACGTGGTGTTCGCGACGTACTCCGGGTTTCATGATGCCC-3'

BPS T135Y anti:

5'-GGGCATCATGAACCCGGAGTACGTCGCGAACACCACGTGTG-3'

BPS S136A sense:

5'-ACGTGGTGTTCGCGACGACCGCCGGGTTTCATGATGCCCCGGG-3'

BPS S136A anti:

5'-CCCGGGCATCATGAACCCGGCGGTCGTCGCGAACACCACG-3'

BPS T197I sense:

5'-TGTGCGCGGAGAACATCGCCATGACTTTCCAC-3'

BPS T197I anti:

5'-GGAAAGTCATGGCGATGTTCTCCGCGCACACG-3'

BPS M199L sense:

5'-GCGGAGAACACCGCCCTGACTTTCCACGC-3'

BPS M199L anti:

5'-GTGGAAAGTCAGGGCGGTGTTCTCCGCGC-3'

BPS M199V sense:

5'-TGTGCGCGGAGAACACCGCCGTGACTTTCCACGCCCCCAAC-3'

BPS M199V anti:

5'-GTTGGGGGCGTGGAAGTCACGGCGGTGTTCTCCGCGCACA-3'

BPS M199V/T200F sense:

5'-TGTGCGCGGAGAACACCGCCGTGTTTTTTCCACGCCCCCAAC-3'

BPS M199V/T200F anti:

5'-GTTGGGGGCGTGGAAAACACGGCGGTGGTCTCCGCGCACA-3'

BPS T200A sense:

5'-GCGCGGAGAACACCGCCATGGCTTTCCACGCCCCCAACGAG-3'

BPS T200A anti:

5'-CTCGTTGGGGGCGTGGAAGCCATGGCGGTGTTCTCCGCGC-3'

BPS T200C sense:

5'-CGCGGAGAACACCGCCATGTGTTTCCACGCCCCCAACGAGTCC-3'

BPS T200C anti:

5'-GGACTCGTTGGGGGCGTGGAACACATGGCGGTGTTCTCCGCG-3'

BPS T200F sense:

5'-GCGCGGAGAGCACCGCCATGTTTTTCCACGCCCCCAACGAGTC-3'

BPS T200F anti:

5'-GACTCGTTGGGGGCGTGGAAAAAACATGGCGGTGTTCTCCGCGC-3'

BPS T200L sense:

5'-CGGAGAACACCGCCATGCTTTTCCACGCCCCCAACGAGTCC-3'

BPS T200L anti:

5'-ACTCGTTGGGGGCGTGGAAAAAGCATGGCGGTGTTCTCCGCG-3'

BPS G214A sense:

5'-CCCACCTAGACGTGATCGTGGCGCAAGCCATGTTCTCAGATGGC-3'

BPS G214A anti:

5'-GCCATCTGAGAACATGGCTTGCGCCACGATCACGTCTAGGTGGG-3'

BPS G214C sense:

5'-CCCACCTAGACGTGATCGTGTGTCAAGCCATGTTCTCAGATGGC-3'

BPS G214C anti:

5'-GCCATCTGAGAACATGGCTTGACACACGATCACGTCTAGGTGGG-3'

BPS M217L sense:

5'-ATCGTGGGGCAAGCCCTGTTCTCAGATGGCG-3'

BPS M217L anti:

5'-CGCCATCTGAGAACCAGGGCTTGCCCCACGAT-3'

BPS MF217/8IL sense:

5'-GACGTGATCGTGGGGCAAGCCATACTCTCAGATGGCGCGGCTGC-3'

BPS MF217/8IL anti:

5'-GCAGCCGCGCCATCTGAGAGTATGGCTTGCCCCACGATCACGTC-3'

BPS F218L sense:

5'-CGTGATCGTGGGGCAAGCCATGCTCTCAGATGGCGCGGCTGCTC-3'

BPS F218L anti:

5'-GAGCAGCCGCGCCATCTGAGAGCATGGCTTGCCCCACGATCACG-3'

BPS S219A sense:

5'-GTGGGGCAAGCCATGTTCGCAGATGGCGCGGCTGCTCTG-3'

BPS S219A anti:

5'-CAGAGCAGCCGCGCCATCTTGCGAACATGGCTTGCCCCACG-3'

BPS I258S sense:

5'-GCCGGGCTCCGACGGGGCGAGCACGGCGCACTTCTACGAGATG-3'

BPS I258S anti:

5'-CATCTCGTAGAAGTGCGCCGTGCTCGCCCCGTCGGAGCCCGGC-3'

BPS I258V sense:

5'-GTGCCGGGCTCCGACGGGGCGGTAACGGCGCACTTCTACGAG-3'

BPS I258V anti:

5'-CTCGTAGAAGTGCGCCGTTACCGCCCCGTCGGAGCCCCGGCAC-3'

BPS A260G sense:

5'-GACGGGGCGATAACGGGGCACTTCTACGAGATGGG-3'

BPS A260G anti:

5'-CCCATCTCGTAGAAGTGCCCCGTTATCGCCCCGTC-3'

BPS A260L sense:

5'-GGGCTCCGACGGGGCGATAACGCTGCACTTCTACGAGATGGGGATG-3'

BPS A260L anti:

5'-CATCCCCATCTCGTAGAAGTGCAGCGTTATCGCCCCGTCGGAGCCC-3'

BPS M267F sense:

5'-ACGGCGCACTTCTACGAGATGGGGTTCAGCTACTTCCTTAAGGAGGACG-3'

BPS M267F anti:

5'-CGTCCTCCTTAAGGAAGTAGCTGAACCCCATCTCGTAGAAGTGCGCCG-3'

BPS M267L sense:

5'-CACTTCTACGAGATGGGGTTGAGCTACTTCCTTAAGG-3'

BPS M267L anti:

5'-CCTTAAGGAAGATGCTCAACCCCATCTCGTAGAAGTG-3'

BPS M267L/Y269F sense:

5'-CACTTCTACGAGATGGGGTTGAGCTTCCTTCCTTAAGGAGGACG-3'

BPS M267L/Y269F anti:

5'-ACGTCCTCCTTAAGGAAGAAGCTCAAACCCCATCTCGTAGAAGTG-3'

BPS Y269A sense:

5'-TCTACGAGATGGGGATGAGCGCCTTCTTAAGGAGGACGTCATCCC-3'

BPS Y269A anti:

5'-GGGATGACGTCCTCCTTAAGGAAGGCGGCTCATCCCCATCTCGTAGA-3'

BPS Y269F sense:

5'-TACGAGATGGGGATGAGCTTTCTCCTTAAGGAGGACG-3'

BPS Y269F anti:

5'-CGTCCTCCTTAAGAAAGAGGCTCTACCCCATCTCGTA-3'

BPS Y269V sense:

5'-CTACGAGATGGGGATGAGCGCTCTCCTTAAGGAGGACGTT-3'

BPS Y269V anti:

5'-ACGTCCTCCTTAAGGAAGACGGCTCATCCCCATCTCGTAG-3'

BPS N282S sense:

5'-GTCATCCCTCTCTTCCGTGATAGCATCGCCGCCGTCATGGA-3'

BPS N282S anti:

5'-TCCATGACGGCGGCGATGCTATCACGGAAGAGAGGGATGAC-3'

BPS G342A sense:

5'-CCTCGGCGAGTACGGGAACATGGCGTCAGCCTGCGTGATGTTTCATCC-3'

BPS G342A anti:

5'-GGATGAACATCACGCAGGCGTACGCCCATGTTCCCGTACTCGCCGAGG-3'

BPS G342F sense:

5'-CTCGGCGAGTACGGGAACATGTTCTCAGCCTGCGTGATGTTTCATCC-3'

BPS G342F anti:

5'-GGATGAACATCACGCAGGCTGAGAACATGTTCCCGTACTCGCCGAG-3'

BPS G342I sense:

5'-GTCCTCGGCGAGTACGGGAACATGATATCAGCCTGCGTGATGTTTCATCC-3'



BPS G342I anti:

5'-GGATGAACATCACGCAGGCTGATATCATGTTCCCGTACTCGCCGAGGAC-3'

BPS G342L sense:

5'-CTCGGCGAGTACGGGAACATGCTGTCAGCCTGCGTGATGTTTCATC-3'

BPS G342L anti:

5'-GATGAACATCACGCAGGCTGACAGCATGTTCCCGTACTCGCCGAG-3'

BPS G342N sense:

5'-TCGGCGAGTACGGGAACATGA~~ACT~~CAGCCTGCGTGATGTTTCATCC-3'

BPS G342N anti:

5'-ATGAACATCACGCAGGCTGAGTTCATGTTCCCGTACTCGCCGAGG-3'

BPS G342S sense:

5'-GGCGAGTACGGGAACATGTCGTCAGCCTGCGTGATG-3'

BPS G342S anti:

5'-ATCACGCAGGCTGACGACATGTTCCCGTACTCGCC-3'

BPS G342T sense:

5'-CTCGGCGAGTACGGGAACATGACGTCAGCCTGCGTGATGTTTCATC-3'

BPS G342T anti:

5'-GATGAACATCACGCAGGCTGACGTCATGTTCCCGTACTCGCCGAG-3'

BPS G342Y sense:

5'-CTCGGCGAGTACGGGAACATGTACTCAGCCTGCGTGATGTTTCATCC-3'

BPS G342Y anti:

5'-GGATGAACATCACGCAGGCTGAGTACATGTTCCCGTACTCGCCGA-3'

BPS L377F sense:

5'-AGTTCGGCTGCCTCATCGGCTTCGGCCCTGGCCTCACCGTG-3'

BPS L377F anti:

5'-ACGGTGAGGCCAGGGCCGAAGCCGATGAGGCAGCCGAACT-3'

BPS L377G sense:

5'-AGTTCGGCTGCCTCATCGGCGGCGGCCCTGGCCTCACCGTG-3'

BPS L377G anti:

5'-ACGGTGAGGCCAGGGCCGCCGCCGATGAGGCAGCCGAACT-3'

BPS L377S sense:

5'-AGTTCGGCTGCCTCATCGGCTCCGGCCCTGGCCTCACCGTG-3'

BPS L377S anti:

5'-ACGGTGAGGCCAGGGCCGGAGGCGATGAGGCAGCCGAACTC-3'

BPS L377T sense:

5'-AGTTCGGCTGCCTCATCGGCACGGCCTCACCGTG-3'

BPS L377T anti:

5'-ACGGTGAGGCCAGGGCCGGTGCCGATGAGGCAGCCGAACTC-3'

## 2.2 Geräte

Gerät	Name	Hersteller
<b>Waagen</b>	Analysen- und Feinwaagen	Sartorius
<b>Wasserbad</b>	Typ 3041	Kottermann
<b>Wasserbad</b>	Exatherm U3	Julabo
<b>Heizblock</b>	Dri-Block DB3D	Techne
<b>Inkubator</b>	HT	Infors
<b>Zentrifuge</b>	Universal 32R	Hettig
<b>Zentrifuge</b>	Biofuge 13	Heraeus Sepatech
<b>GC-MS 1</b>	Agilent 6890 N	Agilent
	Gaschromatograph direkt gekoppelt mit GCmate II	JEOL
<b>GC-MS 2</b>	Hewlett Packard 5890 A Gaschromatograph direkt gekoppelt mit TSQ 700	Hewlett Packard
		Finnigan
<b>HPLC-DAD</b>	600s Kontroller	Waters
	996 Photodiode Array Detector	Waters
	717 plus Autosampler	Waters
	Millenium 2010 Chromatography Manager	Waters
<b>HPLC-Dual <math>\lambda</math></b>	1525 Binary HPLC Pump	Waters
	2487 Dual $\lambda$ Absorptionsdetektor	Waters
	Breeze GBC Software	Waters
<b>FPLC</b>	FPLC Biologic-System	Bio Rad
	Kontroller	Bio Rad
	Fraktionensammler 2128	Bio Rad
<b>Photometer</b>	Ultraspec 1000	Pharmazia Biotech
<b>Spannungsgeber</b>	Standard Power Pack P25	Biometra
	Power Pack 300	Bio Rad

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Elektrophorese</b>	DNA: Sub Cell GT	Bio Rad
	Wide-Mini-Sub Cell GT	Bio Rad
	Mini-Sub Cell GT	Bio Rad
	ProteinKammer	Biometra; Fa. Bio Rad
<b>Vakuumkonzentrator</b>	Speedvac Genelac SF 50	Biometra
<b>Geldokumentation</b>	Multimage <sup>TM</sup> Light Cabinett	Alpha Innotech Corporation
<b>pH-Meter</b>	Digital pH Meter 325	WTW (Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten)
<b>Autoklav</b>	Vapoklac	Sterilco
<b>Reinluft</b>	LaminAir HLB 2472	Heraeus
<b>Reinstwasser</b>	Milli-Q Reagent Water	Millipore

### 3. Methoden

#### 3.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Bei der HPLC-Analytik werden Stoffe aufgrund ihrer Polarität mittels einer stationären Phase (bestehend aus Octadecyl-oberflächenderivatisiertem Trägersilikat) und einer mobilen Phase (binärer Flüssigkeitsgradient) von einander getrennt, um sie anschließend einzeln mittels eines UV/VIS- oder Photo-Array-Detektors zu bestimmen.

##### 3.1.1 Instrumentierung

###### HPLC mit Dual $\lambda$ Absorptionsdetektor

Pumpe: 1525 Binary HPLC-Pump (Waters)

Detector: 2487 Dual  $\lambda$  Absorptionsdetektor (Waters)

Software: Breeze GPC (Waters)

Trennsäule: Hypersil Gold 150 x 4,6 mm (Thermo Electron Corporation)

###### HPLC-Dioden-Array-Detektor

Pumpe: 600s Controller (Waters)

Detektor: 996 Photodiode Array Detektor (Waters)

Automatischer Probenzieher: 717 plus Autosampler (Waters)

Software: Millennium 2010 Chromatography Manager (Waters)

Trennsäule: Hypersil Gold 150 x 4,6 mm (Thermo Electron Corporation)

##### 3.1.2 Fließmittel (mobile Phase)

Sämtliche Auftrennungen der Analysenprodukte sowie die Identifizierungs- und Charakterisierungs-Chromatogramme werden mit einem binären Gradienten ermittelt. Hierbei wird Reinstwasser (mit Phosphorsäure auf pH 2,25 eingestellt) und Methanol für HPLC eingesetzt.

Die Flussrate beträgt 0,5 ml/min. Die Zusammensetzung des Eluenten wird nach folgendem Schema zeitlich variiert (Tabelle 2).

*Tabelle 2: HPLC-Gradient*

<b>Zeit [min.]</b>	<b>Wasser (pH: 2,25) - Anteil [%]</b>	<b>Methanol (für HPLC) – Anteil [%]</b>
0	50	50
2	50	50
12	30	70
20	10	90
21	5	95
23	5	95
25	50	50
30	50	50

## **3.2 Analytik mittels gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)**

### **3.2.1 GC-MS-Analytik**

Mit Hilfe der GC-MS-Analytik werden in dieser Arbeit verschiedene Enzymprodukte zunächst über Gaschromatographie voneinander getrennt und anschließend mittels Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI-MS) charakterisiert. Die Identifizierung erfolgt anhand der eingesetzten Vorstufen im Enzymassay und der daraus zu erwartenden Molekülstruktur anhand des  $M^+$ -Signals. Zur Identifizierung werden entsprechende Referenzsubstanzen analog analysiert. Sind diese nicht verfügbar wird die Struktur soweit wie möglich anhand des Fragmentierungsmusters ähnlicher Verbindungen charakterisiert.

### 3.2.2 Instrumentierung

#### GC-MS 1:

Trennsäule: J&W HP-5, 30 m x 0,32 mm ID,  $t_f=0.25\mu\text{m}$

Injektionsvolumen: 1  $\mu\text{l}$

Injektor und Transferline: 280°C

Temperaturprogramm: 70°C (3 min), 10°C/min - 310°C (5 min)

Splitverhältnis: 1:20

Gasfluß: 1,6 ml/min He

Die Kapillarsäule wurde direkt mit einem doppelfokussierenden Sektorfeldmassenspektrometer (JEOL GCMate II) gekoppelt.

#### GC-MS 2:

Trennsäule: ZB-1, 30 m x 0,32 mm ID,  $t_f=0.25\mu\text{m}$

Injektionsvolumen: 1  $\mu\text{l}$

Injektor und Transferline: 250°C

Temperaturprogramm: 70°C (3 min), 10°C/min. - 310°C (5 min)

Splitverhältnis: 1:20

Gasfluß: 1,6 ml/min He

Die Kapillarsäule wurde direkt mit einem Triple-Quadrupole-Massenspektrometer Finnigan TSQ 700 gekoppelt.

### 3.2.3 Probenbereitung

Die enzymatischen Produkte werden nach einem Standardverfahren silyliert (Liu et al., 2007). Das Lösemittel wird unter Stickstoff entfernt und das getrocknete Produkt (ca. 0,2 mg) in 100  $\mu\text{l}$  MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei 70 °C inkubiert und anschließend direkt mittels GC-MS analysiert.

### 3.3 Fast protein liquid chromatography (FPLC)

#### 3.3.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der Interaktion zwischen einer Matrix und dem zu reinigenden Protein. Nach der Zellyse und der Zentrifugation befinden sich in der Lösung neben dem Zielenzym noch sämtliche aus *E. coli* stammenden löslichen Zellproteine. Da eine spezifische Aktivität des im Interesse stehenden Proteins nur unter Ausschluß von Fremd-molekülen untersucht werden kann, müssen diese von dem Enzym getrennt werden. Das aufzureinigende Enzym besitzt die Eigenschaft, sich an die Matrix zu binden und kann somit vom Rest des Extraktes getrennt werden. Anschließend muss das Protein von der Matrix mittels eines Elutionspuffers abgelöst werden.

##### 3.3.1.1 Instrumentelle Aufreinigungsmethode von GST-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung wird folgendermaßen durchgeführt:

cDNAs werden in den Vektor p-GEX-G hineinkloniert, was zur Gewinnung von GST-Fusionsproteinen führt. Die Aufreinigung erfolgt mittels der GSTrap<sup>TM</sup>-Säule (1ml; Amerschen Biosciences). Der bei der Zellysis angefallene bakterielle Rohextrakt wird auf eine mit Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Alle unspezifischen Proteine lassen sich in den ersten 20 min durch Kaliumdihydrogenphosphat- und PBS-Puffer (2.1.3.2) entfernen. Anschließend wird das an die Matrix gebundene GST-Fusionsprotein mit einem linearen Gradienten des Elutionspuffers (2.1.2.2) ausgewaschen (Tabelle 3). Achtzehn 0,5 ml-Frak-tionen werden gesammelt und jede Einzelne nach Bradford (3.5.1) auf die Proteinmenge geprüft. Über ein SDS-Gel kann die Reinheit des Proteins bestimmt werden.



Tabelle 3: FPLC-Programm für die Affinitätschromatographie mittels maschineller GSTrap-Aufreinigung

Schritt	Zeit [min.]	Funktion	Puffer	Volumen/Fluss
1	29,0	Collect fractions within 1 time window ending at 39 ml		
2	0,0	Set zero baseline	UV-Detector	
3	0,0	Isocratic flow	A-buffer 2 100% buffer B 0%	Vol. 3,0 ml flow 1 ml / min
4	3,0	Load/inject sample	load M 260L statistic loop auto inject valve	Vol. 3,0 ml 0,3 ml / min
5	6,0	Isocratic flow	A-buffer 2 100% buffer B 0%	Vol. 10,0 ml 1 ml / min
6	16,0	Isocratic flow	A-buffer 4 100% buffer B 0%	Vol. 10,0 ml 1 ml / min
7	26,0	Isocratic flow	A-buffer 2 100% buffer B 0%	Vol. 3,0 ml 1 ml / min
8	29,0	Isocratic flow	A-buffer 2 0% buffer B 100%	Vol. 5,0 ml 1 ml / min
9	34,0	Isocratic flow	A-buffer 2 100% buffer B 0%	Vol. 5,0 ml 1 ml / min
	39,0	End of protocol		

### 3.3.1.2 Manuelle Aufreinigungsmethode von GST-Fusionsproteinen

Bei der manuellen Aufreinigungsmethode von GST-Fusionsproteinen führt man *de facto* die selben Schritte durch wie bei der instrumentellen Methode.

Nachdem die Bakterien lysiert bzw. sonifiziert und die festen Bestandteile abzentrifugiert sind, wird der Überstand mit flüssiger Glutathion-Agarose als Matrix versetzt und das Protein für eine Stunde unter laufender Zirkulation bei 4 °C an die Matrix gekoppelt. Die Lösung wird anschließend in eine leere PD-10-Säule gegeben, in der allerdings der Filter noch vorhanden ist. Er dient als Filtersystem, durch das keine Agarose-Matrix abfließen kann. Der Durchlauf wird für eventuelle Nachuntersuchungen aufgefangen und bei -20 °C gelagert. Die Glutathion-Agarose mit dem gebundenen Protein wird zunächst mit 4 ml Puffer 2 (Waschpuffer) gewaschen und anschließend mit 4 ml Puffer 4 gespült. Nach nochmaliger Zugabe von 2 ml Puffer 2 folgt die Desorption des Proteins mit 3,5 ml Elutionspuffer (Puffer B) von der Glutathion-Agarose-Matrix. Dies beinhaltet sieben einzelne Schritte, wobei jeweils 0,5 ml Puffer B ver-

wendet werden. Anschließend werden zur Stabilisierung der Proteine 15 % Glycerol hinzu gegeben und die Einzelfractionen bei -20 °C gelagert.

### **3.3.1.3 Ni-NTA-Agarose (His-Trap-Aufreinigung)**

Des Weiteren wird zur Proteinaufreinigung die sog. His-Trap-Aufreinigungsmethode angewendet. Hierbei wird die cDNA der Polyketidsynthase in einen Vektor (pRSet B) kloniert, der so aufgebaut ist, dass am N-Terminus des exprimierten Enzyms eine Sequenz von 6 Histidin-Resten angehängt ist. Histidin besitzt eine hohe Anlagerungsaffinität zu 2-wertigen Kationen wie z. B.  $\text{Ni}^{2+}$ .

#### **Durchführung:**

Die nach der Induzierung abzentrifugierten Bakterien liegen als Pellets vor. Diese werden mit Lysis-Puffer resuspendiert und mittels Sonifier (Ultraschall) zerstört. Die festen Bakterienzellfragmente werden durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand mit dem relevanten gelösten Protein wird mit Ni-NTA-Agarose (Säulenmaterial), bei dem Ni fest an Agarose gebunden ist, für eine Stunde bei 4 °C gekoppelt. Das Gemisch wird über eine leere PD10-Säule filtriert, wobei die Ni-Agarose mit dem gebundenen Protein vom Filter zurück gehalten und anschließend mit Waschpuffer gereinigt wird. Um das Protein wieder vom Nickel lösen zu können, wird ein Molekül benötigt, das eine größere Affinität zu dem 2-wertigen Kation besitzt, was für Imidazol zutreffend ist. Mit der als Elutionspuffer hoch konzentrierten Imidazollösung lässt sich das Protein von der Säule eluieren. In der aufgefangenen Lösung ist das gewünschte Protein enthalten.

Um es dauerhaft lagern zu können, wird umgepuffert, weil Imidazol bei -20 °C auskristallisiert, und somit das Protein irreversibel denaturiert.

Die Umpufferung geschieht mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (PD10-Säulen; Amersham Biosciences). Zunächst werden diese Säulen mit Lysis-Puffer (ohne Imidazol) äquilibriert. Anschließend gibt man 2,5 ml Proteinlösung mit Imidazol auf die Säule und eluiert mit 3,5 ml Lysis-Puffer. Nach Zugabe von 15 % Glycerol zur Stabilitätserhöhung des bei -20 °C zu lagernden Proteins erfolgt eine Bradford-Bestimmung (3.5.1), um die Konzentration des Proteins in der Lösung zu ermitteln.

### 3.4 Radioscan-Analyse

Neben den üblichen HPLC-DAD-Analyseverfahren werden die enzymatischen Produkte auch nach Inkubation mit radioaktiv markiertem Malonyl-CoA untersucht. Dazu wird jedem Inkubationsansatz zusätzlich zu kaltem Malonyl CoA auch [2-<sup>14</sup>C] Malonyl CoA (0,93 kBq Gesamtaktivität) hinzugegeben. Die Produkte werden mit Ethylacetat extrahiert, im Vakuum zur Trockne eingengt, mit 20 µl Ethylacetat aufgenommen, auf eine DC Platte (Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm; Merk, Damstadt) aufgetragen und chromatographiert (Fließmittel: Chloroform 65 Teile, Methanol 25 Teile, Wasser 4 Teile). Nach abgeschlossener Auftrennung wird mittels Radio-Scanner RITA (Raytest) detektiert und quantifiziert.

### 3.5 Enzyminkubationen

#### 3.5.1 Bestimmung von Proteingehalten

Der Proteingehalt wird nach der Methode von Bradford (1976) ermittelt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wird als Standard Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Verschiedene Stammlösungen, die 1 – 10 µg BSA enthalten, werden mit Millipore-Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend werden 0,9 ml frisch hergestellte Bradford-Lösung hinzugefügt. Alle Einzelproben werden vorsichtig gemischt und nach 5 min bei 595 nm im UV-VIS-Photometer vermessen. Die Kalibriergerade ergibt sich aus den Messwerten einer seriellen Verdünnung von BSA durch lineare Regression. Lösungen mit Proteinen unbestimmten Gehalts werden mit 0,9 ml Bradford-Lösung gemischt, ebenfalls auf 1 ml mit Reinstwasser aufgefüllt und nach 5 min vermessen. Der Gehalt an Protein wird aus den Extinktionsmesswerten mittels der Geradengleichung der Kalibrierfunktion ermittelt.

#### 3.5.2 Polyketidsynthase-Ansätze

Die Inkubationsansätze (siehe unten) werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 37 °C für 45 min inkubiert. Eine Probe mit denaturiertem Enzym dient jeweils als Negativkontrolle. Dazu wird das Enzym mit dem Puffer vor Zugabe der jeweiligen Substrate in einem Heizblock bei 95 °C für 45 min erhitzt.

Nach der Inkubation wird der Enzymsatz mit 50 %iger Essigsäure (Endkonzentration 5 %) versetzt und zwei Mal mit dem Enzymsatzvolumen Ethylacetat extrahiert. Um eine schnelle und saubere Phasentrennung zu erhalten, werden die Gemische bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Ethylacetatphasen werden anschließend zur Trockne eingedampft und die Rückstände mit 50 %igem Methanol für die HPLC-Analyse aufgenommen.

Die Enzymsätze enthalten jeweils 2 µg gereinigtes Protein und 23,1 µM Malonyl-CoA. Zusätzlich werden als Startersubstrate Benzoyl-CoA und *m*-Hydroxybenzoyl-CoA mit einer jeweiligen Konzentration von 5,7 µM inkubiert (Liu et al. 2003).

## **3.6 Charakterisierung überexprimierter Proteine**

### **3.6.1 Bestimmung von pH- und Temperatur-Optima**

Für die Ermittlung des pH-Optimums werden verschiedene Kaliumphosphat-Puffer mit pH-Werten von 4,5 bis 9,0 eingesetzt und jeder Enzymsatz für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei werden jeweils 2 µg gereinigtes Protein eingesetzt. Die Temperatur-Bestimmung erfolgt bei einem pH von 7,5. Die Inkubationen werden bei Temperaturen von 10 – 45 °C für 10 Minuten durchgeführt. Mittels HPLC-Analyse der Produktmengen lassen sich sowohl der optimale pH-Wert als auch die optimale Temperatur für die Enzymreaktion ermitteln.

### **3.6.2 Untersuchung der Substratspezifität**

2 µg des jeweils gereinigten Enzyms werden bei optimaler Temperatur und optimalem pH-Wert mit verschiedenen Starter-Substraten inkubiert. Als Kettenverlängerer dient zusätzlich zu normalem Malonyl-CoA auch noch [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA (0,93 kBq als Gesamtaktivität pro Inkubationsansatz).

Folgende Startersubstrate werden untersucht:

Benzoyl-CoA, *o*-Hydroxybenzoyl-CoA, *m*-Hydroxybenzoyl-CoA, *p*-Hydroxybenzoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA, Cinnamoyl-CoA und Acetyl-CoA.

Nach erfolgter Inkubation werden die Ansätze mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die Extrakte eingedampft. Die Rückstände werden mit 20 µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgebracht. Die Auftrennung erfolgt mit einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform (65 Volumenteile), Methanol (25 Volumenteile) und Wasser (4 Volumenteile). Detektiert wird mit dem Radio-Scanner RITA, wobei für die Zuordnung der einzelnen Peaks Referenzsubstanzen, soweit vorhanden, vor der Auftrennung auf die Platte aufgetragen werden.

Zusätzlich zu der radioaktiven Methode werden mit nicht-markiertem Malonyl-CoA Inkubationen durchgeführt und die entstandenen Produkte mittels HPLC-DAD analysiert. Die entsprechenden Rückstände werden in diesem Fall in 100 µl Methanol (50%) aufgenommen. Davon werden jeweils 75 µl in die HPLC injiziert.

### **3.6.3 Bestimmung von kinetischen Daten**

Für die bevorzugten Substrate werden die  $K_m$ - und  $K_{cat}$ -Werte ermittelt. Dafür werden jeweils 2 µg gereinigtes Protein mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen im pH- und Temperatur-Optimum eingesetzt. Die Inkubationszeit liegt bei 10 Minuten. Die Konzentrationen der Substrate liegen zwischen 0,125 und 4 x  $K_m$  (Liu et al., 2003). Das zweite Substrat wird bei den Inkubationen immer in der Sättigung zugegeben. Die quantitative Analyse der mit zunehmender Substratkonzentration zunehmenden Produktmengen erfolgt durch HPLC-DAD. Die Berechnung der kinetischen Daten erfolgt mittels des Programms „Sigma-Plot Swift 1000“.

## **3.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels dieser Methode lassen sich die Größe bzw. die Untereinheiten-Molekulargewichte von Proteinen bestimmen (Laemmli, 1970).

### **3.7.1 Herstellung des Gels und Probenvorbereitung**

Die Elektrophorese wird in einer Kammer für vertikale Plattengele durchgeführt. Für die Herstellung des Trenngels werden 1,5 M Tris-HCL-Puffer, Reinstwasser und 10 %iges SDS miteinander vermischt. Nach Zugabe von 0,1 ml einer 10 %igen APS-Lösung und 5 µl

TEMED wird die Lösung zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit Wasser überschichtet. Bei Raumtemperatur bildete sich ein stabiles Gel. Nach der Verfestigung wird das Wasser entfernt und das frisch hergestellte Sammelgel (0,5 M Tris-HCL-Puffer, 10 % SDS, 10 % APS, TEMED und Reinstwasser) aufgetragen. Anschließend wird der Taschenformer in Form eines Kamms eingesetzt. Nach der Auspolymerisierung wird der Kamm entfernt und in die Taschen die Proteinproben (je 2 µg) pipettiert. Zu den Proben werden vorher 15 µl Probenpuffer (β-Mercaptoethanol-haltig) hinzugemischt und mit Reinstwasser auf 20 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wird für 10 min bei 90 °C erhitzt. Zusätzlich wird in eine Tasche ein Größenmarker (MWG Technologies, Invitrogen) geladen.

### **3.7.2 Elektrophorese und Detektion der Proteinbanden**

Zunächst wird die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt und Spannung an die Elektroden angelegt. Die Trennung der Proteine erfolgt bei 200 V, 15 W und 75 mA. Nach der Elektrophorese wird zur Detektion das Trenngel für eine Stunde in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in Entfärberlösung mehrere Stunden behandelt. Auf diese Weise werden die Proteinbanden sichtbar gemacht.

### **3.7.3 Bestimmung des Molekulargewichts**

Mit Hilfe der Protein-Leiter lässt sich das Gewicht des untersuchten Proteins bestimmen. Die Protein-Leiter besteht aus Proteinen definierter Größe.

## **3.8 Molekularbiologische Methoden**

### **3.8.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli***

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt im LB-Medium (2.1.3.1). Für Transformationen wird *E. coli* in SOC-Medium angezogen und auf festem LB-Medium ausplattiert, um Einzelkolonien zu erhalten. Diese werden für Plasmidpräparationen über Nacht in 5 ml LB-Medium kultiviert. Für die Proteinüberexpression wird *E. coli* in 100 ml LB-Medium in einem Inkubationsschrank bei 37 °C auf einem Rundschtüttler angezüchtet. Die Proteinexpression erfolgt bei

25 °C. Bei allen Schritten wird zur Selektion der Bakterien das jeweilige Antibiotikum hinzu gegeben.

### **3.8.2 Lagerung von Bakterienkulturen**

Eine kurzfristige Lagerung der Kulturen ist auf Agar-LB-Platten, die zuvor mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt werden, für 4-6 Wochen möglich. Um eine längere Lagerung ohne Beeinträchtigung der bakteriellen Eigenschaften zu erreichen, werden so genannte Glycerol-Kulturen angelegt. Hierbei werden der Bakterienkultur in der logarithmischen Wachstumsphase (10 ml LB-Medium, 10 h, 37 °C) ein Aliquot von 0,5 ml entnommen und mit 0,5 ml Glycerol (>85 %) vermischt. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgt bei -80 °C.

### **3.8.3 Messung der optischen Dichte (OD)**

Zur Abschätzung des Bakterienwachstums dient eine Methode nach Bertram und Gassen (1991). Die Bakteriensuspensionstrübung wird bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Der Null-Abgleich erfolgt mit unbeimpfter Lösung. Eine Absorption bei  $OD_{600} = 1$  entspricht in etwa der Bakterienzellzahl  $8 \times 10^8$ .

### **3.8.4 Oligonukleotide**

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden ausnahmslos von der Fa. MWG-Biotech hergestellt. Die Sequenzierprimer besitzen in der Regel eine Länge von 18-25 Basen und einen Schmelzpunkt von 55-65 °C. Die Mutationsprimer haben eine Länge von bis zu 40 Basen, wobei der Schmelzpunkt bei ca. 72 °C oder höher liegt. Der GC-Anteil beträgt, wenn möglich, 40-60 %.

### **3.8.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Um nach erfolgter Plasmidisolierung die Reinheit des Vektors zu bestimmen und um die entsprechende Plasmidmenge für weitere Transformationen zu erhalten, führt man die Nukleinsäurekonzentrationsmessung nach Sambrook et al. (1989) durch. Die Absorption der

Nukleinsäurelösung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

Nukleinsäurekonzentration ( $c_{(NA)}$ ) =  $A_{260}$  x Absorption x Verdünnung

$A_{260}$ : Absorptionskoeffizient

Die Absorptionskoeffizienten für die verschiedenen Nukleinsäuren sind:

dsDNA:  $1,0 A_{260} \approx 50 \mu\text{g/ml}$

ssDNA und RNA:  $1,0 A_{260} \approx 33 \mu\text{g/ml}$

Oligonukleotide:  $1,0 A_{260} \approx 20 \mu\text{g/ml}$

Bei einer Wellenlänge von 280 nm werden Proteine erfasst. Das Verhältnis von  $A_{260} / A_{280}$  zeigt die Reinheit der Lösung an. Es sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein niedrigerer Wert deutet auf Verunreinigungen mit Proteinen hin. Die untere Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei ca. 100 ng/ $\mu\text{l}$ .

### 3.8.6 Fällung von DNA

Die Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol dient einerseits zur DNA-Aufkonzentrierung, zum anderen werden dabei auch Fremdstoffe in Form von niedermolekularen Bestandteilen von der DNA abgetrennt. Die DNA wird mit 40  $\mu\text{l}$  Wasser, 5  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat-Lösung und 125  $\mu\text{l}$  Ethanol gefällt und für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das entstehende DNA-Sediment wird 2x mit 300  $\mu\text{l}$  70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min bei 13000 rpm) und anschließend bei 37 °C getrocknet.

## 3.9 Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction; PCR)

In dieser Arbeit kommen zwei verschiedene Typen der PCR zur Anwendung:

Die für die Mutationsherstellung verwendete PCR nach dem *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene und zur Überprüfung der Mutations-PCR-Produkte eine Sequenzierungs-PCR.



Das Prinzip einer PCR ist eine exponentielle enzymatische Vermehrung eines kompletten Plasmids (z. B. Mutations-PCR) oder aber nur eines DNA-Abschnitts (z. B. Sequenzierungs-PCR).

Bei der Mutations-PCR werden die Primer gegenläufig an die komplementären DNA-Stränge spezifisch gebunden (Abb.12). Als Matrize (template) dient hierbei der Vektor, in den die cDNA der Benzophenonsynthase vorher hinein kloniert wurde. Bei Mehrfachmutationen dient oftmals bereits veränderte DNA aus vorangegangenen Mutations-PCRs als Matrize. Liegen die zu mutierenden Positionen in der DNA nebeneinander, kann ein zweifach verändertes Mutationsprimerpaar für eine Mutations-PCR verwendet werden. Die DNA-Polymerase, in diesem Fall die *Pfu-Polymerase*, fügt Nucleotide an der 3'OH-Gruppe von Primern an und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. Die *Pfu-Polymerase* besitzt außerdem noch korrekturlesende Eigenschaften (proofreading), das heißt, sie hat 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Diese Polymerase ist in der Lage, falsch eingebaute Basen zu korrigieren und so die Ablesefehlerrate wesentlich zu verringern.

Eine Vermehrung von DNA erfolgt in drei Schritten:

1. Denaturierung: Die DNA wird bei 95 °C 30 sec in die jeweiligen Einzelstränge getrennt.
2. Annealing: Die Temperatur wird auf 56 °C für 40 sec gesenkt, damit sich die spezifischen Mutationsprimer anlagern können.
3. Extension: Bei 72 °C wird der komplementäre DNA-Strang durch Verlängerung des Primers hergestellt. Allgemein gilt, dass eine Minute für die Verlängerung des Primers um 1000 bp ausreichend ist. Da in der Mutations-PCR der gesamte Vektor amplifiziert wird, errechnet sich dabei eine Zeit von 14 min.

Die drei Zyklen werden 25 mal durchlaufen. Für die Herstellung der Mutations-DNA wird jeweils eine sogenannte „Hot-Start-PCR“ durchgeführt, das heißt die *Pfu-Polymerase* wird beigefügt, wenn das Plasmid denaturiert in Form von zwei Einzelsträngen vorliegt.

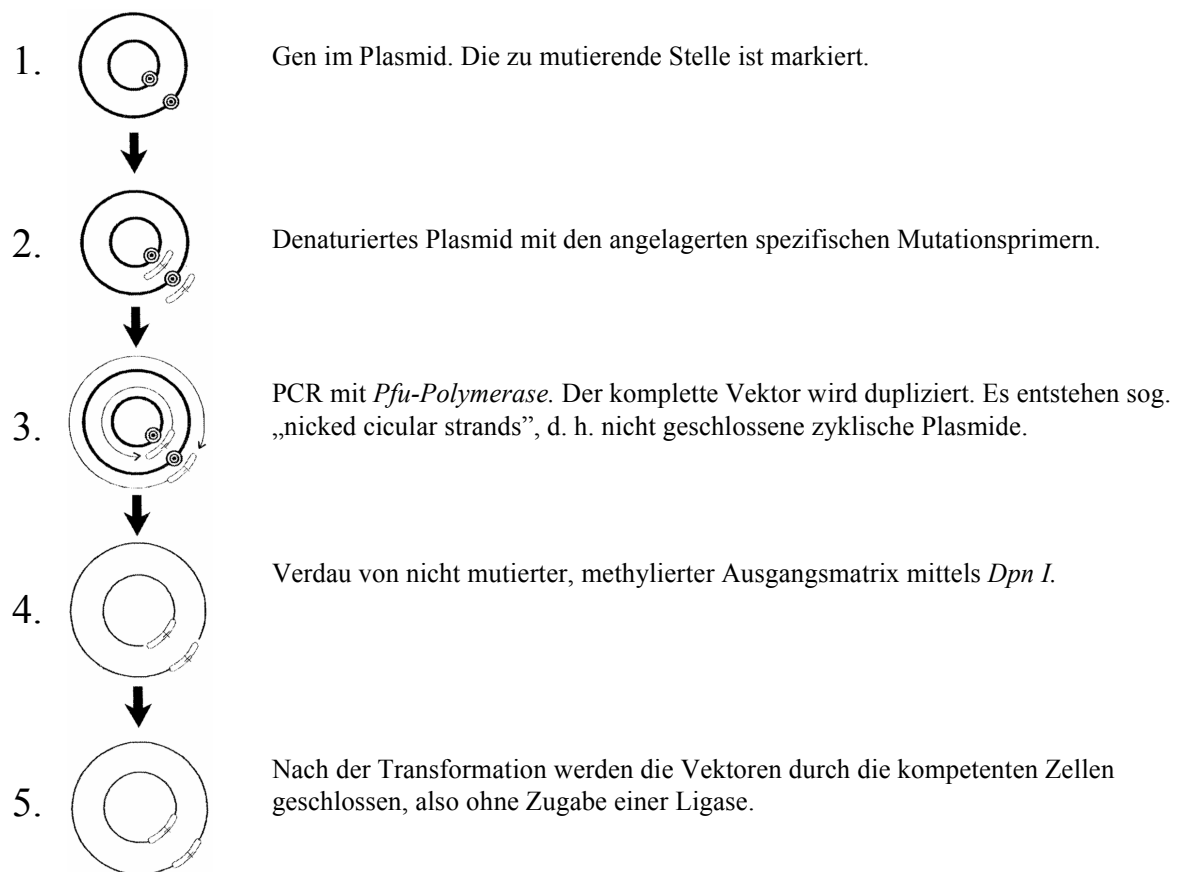


Abbildung 12: Mutations-PCR-Ablauf (nach QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene)

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Mutations-PCR wird das PCR-Produkt nach Verdau der Ausgangsmatrix mit *Dpn I* zunächst in kompetente *E. coli* DH 5 $\alpha$ -Bakterienzellen transformiert. Nach Anreicherung der Bakterienzellen mit dem implementierten Plasmid wird dieses isoliert und der Bereich, in dem die zu mutierende Stelle liegt, sequenziert.

Für diese Sequenzierung wird das automatische Sequenzier-System von Applied Biosystems (Weiterstadt), Modell 377, verwendet. Dieses Gerät ermöglicht es, die durch Fluoreszenzfarbstoffe markierten DNA-Fragmente während eines Polyacrylamidgellaufs automatisch zu erfassen. Dafür ist die Verwendung einer online-Detektion und der Einsatz eines Lasers zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen notwendig. Bei diesen Markierungen an der DNA erfolgt am 3'-Ende ein Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden als Terminatoren.

Der BigDye Cycle Sequenzierungs-Kit von Applied Biosystems (Weiterstadt) enthält alle für die Sequenzierung erforderlichen Lösungen einschließlich der *Taq*-Polymerase. Als Matrize

dient gereinigte, aus DH 5 $\alpha$ -Bakterienzellen isolierte und vorher mutierte Plasmid-DNA. Die jeweilige DNA-Konzentration wird UV-spektrometrisch (3.8.5) bei 260 nm bestimmt.

Die Wahl des Primers basiert darauf, welche Position der Nucleotide in der BPS-cDNA mutiert und kontrolliert werden muß (2.1.6).

Die Bestandteile des Sequenzierungsansatzes sind:

BigDye Lösung: 2  $\mu$ l

DNA Template: 700 ng

Primer: 2 pmol

Reinstwasser ad 10  $\mu$ l

Das Programm im Thermocycler ist wie folgt aufgebaut:

1. Denaturierung: 15 sec bei 94 °C
2. Annealing: 25 sec bei 48 °C 30 Zyklen
3. Elongation: 1 min 30 sec bei 72 °C

Danach werden überschüssige Primer, freie Nukleotide und Dye-Terminatoren entfernt (3.8.6). Das getrocknete Pellet wird vor dem Auftragen auf das Gel zunächst mit 2  $\mu$ l Lade-puffer (2.1.3.5) aufgenommen, bei 95 °C für 90 sec denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

### 3.9.1 Sequenziergel

Die genaue Zusammensetzung des Sequenziergels ist unter 2.1.3.5 zu finden. Zunächst werden 9 g Harnstoff in 30 % Acrylamid, 10x TBE-Puffer und Reinstwasser gelöst. Anschließend gibt man 10  $\mu$ l TEMED und 230  $\mu$ l 10 % APS-Lösung hinzu und gießt diese Lösung zwischen zwei Glasplatten, wobei die Schichtdicke des Gels 0,2 mm beträgt. APS-Lösung und TEMED werden als Polymerisationsstarter hinzu gegeben. Nach einer Wartezeit von 1 h kann das Gel mit den Produkten der Sequenzierreaktion (3.9) beladen werden.

### 3.9.2 Auswertung der Sequenzierdaten

Mit Hilfe des Softwareprogramms Lasergene 99 DNA STAR werden die erhaltenen Sequenzen ausgewertet und bestimmt.

### 3.10 Expression von GST-Fusionsproteinen und His-Tag-Proteinen

Nach der Klonierung der BPS in den Vektor p-GEX-G (Liu et al., 2003) kann die BPS in Fusion mit der Glutathion-S-Transferase von *E. coli* exprimiert werden. Die Aufreinigung erfolgt nach 3.3.1.1 bzw. 3.3.1.2. Es besteht eine starke Bindung zwischen der Glutathion-S-Transferase und seinem Substrat Glutathion. Das Fusionsprotein lässt sich somit spezifisch an eine Glutathion-Sepharose-Matrix binden und anschließend mit freiem Glutathion eluieren.

Andererseits besitzt die BPS, wenn sie mit Hilfe des Vektors pRSet-B exprimiert wird, durch die am N-Terminus gebundenen sechs Histidin-Reste eine sehr hohe Bindungseigenschaft mit zweiwertigem Nickel. Die Aufreinigung erfolgt nach 3.3.1.3. Durch die Komplexbildung von den an Agarose haftenden  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen mit Imidazolderivaten ist es möglich, zunächst das Protein an Ni-NTA-Agarose zu binden und dieses anschließend mit einer hochkonzentrierten Lösung von Imidazol zu eluieren.

#### 3.10.1 Expression

Sowohl der pRSet-B- als auch der p-GEX-G-Vektor mit Wild-Typ- bzw. mutierter BPS werden in *E. coli* BL 21 (2.1.5.1) transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol als Selektionshilfe ausplattiert. Ein Klon wird über Nacht in einer Lösung von 10 ml LB-Medium, Ampicillin und Chloramphenicol aufgezogen. Davon werden 4 ml zum Animpfen in eine 100 ml LB-Lösung gegeben und bis zu einem Trübungsgrad  $\text{OD}_{600}$  von 0,8 – 1,0 bei 37 °C inkubiert. Die Expression von His-Tag-Protein- und Fusionsprotein erfolgt durch Zugabe von 200 µl steriler IPTG-Lösung sowie 150 µl Ampicillin-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 25 °C in einem Rundschtüttler wird die Kultur bei 5000 rpm 5 min abzentrifugiert.

#### 3.10.2 Zellaufschluss

Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet wird in 1,6 ml Aufschlusspuffer (2.1.3.4) für die Lyse mit 2 mg Lysozym (30 min auf Eis) oder 1,6 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 7-7,5 (2.1.3.1) für die Lyse mittels Ultraschall resuspendiert. Das Lysat wird bei 4 °C für

10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand kann mit der jeweiligen Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (3.3.1).

### 3.11 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, bedient man sich der Elektrophorese in Agarosegelen. Zwischen dem Logarithmus der Länge eines Fragments und der relativen Wanderungsstrecke besteht eine lineare Abhängigkeit.

Je nach der zu erwartenden Größe der aufzutrennenden Fragmente variiert die Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 2 %. Zunächst wird die Agarose in TAE-Puffer gegeben und so lange aufgeköcht, bis sie sich gelöst hat. Anschließend wird sie bis auf 50 – 60 °C abgekühlt. Der Lösung wird Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/10 ml) beigemischt und in eine Elektrophorese-Kammer mit einem Taschenformer in Form eines Kamms gegossen. Nach Erstarrung wird der Kamm entfernt und in die Taschen ein Gemisch aus 2 µl 6x Ladepuffer (zur Abschätzung der Lauflänge) sowie 10 µl DNA-Lösung einpipettiert. Durch Verwendung eines aus DNA-Fragmenten bestehenden Kalibrierstandards bekannter Größen (DNA-Ladder), können die Längen der DNA-Fragmente bestimmt werden. Die DNA wird in TAE-Puffer bei 120 – 140 V (die Spannung ist gelabhängig) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Interkalation von Ethidiumbromid in der DNA kann sie im UV-Licht bei 260 nm detektiert werden.

### 3.12 Transformation von Plasmid in *E. coli*

#### 3.12.1 Herstellung kompetenter Zellen

Um Bakterienkulturen herzustellen, die Fremd-DNA aufnehmen können, wird das Verfahren nach Cohen et al. (1972) angewendet. Eine einzelne *E. coli*-Kolonie wird über Nacht in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in einem Inkubationsschrank auf einem Rundschüttler bei 37 °C angezogen. 1 ml dieser Suspension dient zum Animpfen einer 50 ml LB-Medium-Kultur. Die Bakterien vermehren sich im Inkubationsschüttler bei 37 °C so lange, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 erreicht ist. Alle folgenden Schritte werden auf einem Eisuntergrund, das heißt bei 0 – 4 °C, durchgeführt. Nach der Zentrifugation der 50 ml Bakte-

rienkultur (4 °C, 10 min, 3500 rpm) wird das Pellet in einer vorher auf Eis gekühlten 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und unter den selben Bedingungen erneut zentrifugiert. Dem Bakterienpellet werden erneut 20 ml gekühlter CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugesetzt, resuspendiert und anschließend für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation werden die Bakterienzellen sehr vorsichtig in 2 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % Glycerol (w/v) resuspendiert und in Volumina von jeweils 100 µl aufgeteilt. Die Lagerung findet bei - 80 °C statt.

### 3.12.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid

Durch CaCl<sub>2</sub>-Lösung kompetent gemachte *E. coli*-Zellen (100 µl) werden mit 1 – 2 ng Plasmid gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz 30 s bei 42 °C schockerhitzt (Hitzeschockmethode). Nach dem Erwärmen wird die Bakterienlösung sofort wieder auf Eis gelegt, dort für 2 min gekühlt, bevor man zur Regeneration 900 µl SOC-Medium hinzugibt und diese Suspension bei 37 °C im Rundschüttler inkubiert. Anschließend wird dieser Ansatz für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, 800 µl Lösung werden verworfen und mit den restlichen 200 µl das Pellet resuspendiert. Die Suspension wird anschließend auf einer LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

### 3.12.3 Plasmidkontrolle

Die in dieser Arbeit verwendeten zwei Vektoren enthalten jeweils ein Antibiotikumresistenzgen gegen Ampicillin. Die kompetenten *E. coli* BL 21-Zellen besitzen zusätzlich eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums bzw. der Antibiotika in das Anzucht-Medium wird eine Selektion auf transformierte und nicht transformierte Bakterien-Zellen durchgeführt (3.8.1).

Zusätzlich wird das Plasmid nach seiner Isolierung (3.13) einem Verdau mit Restriktionsenzym unterzogen. Dabei werden 3 µl DNA-Lösung mit 2 µl Puffer O (Orange) (Life Technologies), 14,5 µl Reinstwasser und 0,5 µl *EcoRI* vermischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgt eine Agarose-Gelelektrophorese mit 1 % Agarose (3.11).

Alternativ zur Restriktion mit *EcoRI* kann der Versuch auch mit dem Restriktionsenzym *KpnI* durchgeführt werden. Als Puffer dient dann der *KpnI*-Puffer (Life Technologies). Die jeweiligen Volumina bleiben gleich.

### 3.13 Plasmidisolation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmiden aus den verwendeten *E. coli*-Stämmen erfolgt durch die Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Dolly (1979).

Die Bakterien werden durch alkalische SDS-Lösung lysiert und der gesamte Zellinhalt dadurch in die Lösung freigesetzt. Die sich in Lösung befindliche RNA wird durch Zugabe einer RNase A abgebaut. Anschließend fällt man in der Lösung enthaltene Proteine und chromosomale DNA durch Zumischen von Natriumacetat. Die gesuchte Plasmid-DNA wird durch Isopropanol präzipitiert.

#### 3.13.1 Plasmid-Minipräparation

Eine Übernachtskultur (4 ml) wird bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert. Die Lösung wird verworfen. Das Zellpellet wird in 300 µl Puffer P1 resuspendiert, in den vorher RNase zugegeben wird. Anschließend werden 300 µl Puffer P2 hinzu pipettiert und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur zur vollständigen Lyse inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl Puffer P3 wird vorsichtig, aber sehr gründlich gemischt und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Gefäß pipettiert. Die wässrige Phase mit der in sich befindlichen Plasmid-DNA erhält einen Zusatz des 0,7-fachen Volumens Chloroform und wird zentrifugiert. Nach Abtrennung der wässrigen Phase kann aus dieser die gewünschte Plasmid-DNA durch Zugabe von Ethanol (3.8.6) präzipitiert werden. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation (13000 rpm, 10 min). Die Lösung wird verworfen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Nach Zugabe von 50 µl Reinstwasser kann die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert werden.

## 4. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate werden im folgenden aufgeführt. Dabei werden zum besseren Verständnis Untersuchungen zur Aktivität der Wild-Typ-BPS mit den aromatischen Starter-Substraten Benzoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA vorangestellt. Dann werden die Computerergebnisse der Modellierung sowie die Rückschlüsse daraus präsentiert. Es folgt die Darstellung der durchgeführten Mutationen und der bei den Inkubationen der Enzym-Mutanten erhaltenen Resultate. Die Mutationen werden in der Form benannt, dass der erste Buchstabe die ursprüngliche Aminosäure angibt, die folgenden Ziffern die Position in der Wild-Typ-BPS bezeichnen und der letzte Buchstabe die an dieser Stelle neu eingeführte Aminosäure nennt. Schließlich wird die Mutante T135L (Threonin wurde an Position 135 gegen Leucin ausgetauscht), die die größte Substrat- und Produktspezifitätsänderung aufweist, detaillierter vorgestellt und vergleichend zur Wild-Typ-BPS charakterisiert.

### 4.1 Detektion der Enzymaktivität der Wild-Typ-BPS

Zunächst werden die von Liu et al. (2003) publizierten Ergebnisse zur Aktivität von Wild-Typ-BPS reproduziert.

Die höchste Aktivität der BPS wird mit dem Starter-Substrat Benzoyl-CoA gemessen (Abb. 13). Es entsteht als Hauptprodukt 2,4,6-Trihydroxybenzophenon (Peak 1). Außerdem wird eine kleine Menge 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on als Nebenprodukt detektiert (Peak 2).

Eine hohe Aktivität zeigt die BPS auch mit dem Starter-Substrat 3-Hydroxybenzoyl-CoA (Abb. 16). Als Hauptprodukt der Inkubation entsteht 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon (Peak 3). Als Nebenprodukt wird ein Lakton, das 4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on detektiert, das durch 2-fache Kettenverlängerung entsteht (Peak 4). Die Reaktionsmechanismen sind im Einzelnen in Kapitel 1.1.2 aufgeführt.

Alle Ergebnisse werden durch GC-MS-Analysen bestätigt (3.2). Die entsprechenden MS-Spektren sind in den Abbildungen 14 und 15 für die Substanzpeaks 1 und 2 sowie in den Abbildungen 17 und 18 für die Substanzpeaks 3 und 4 dargestellt.

Die BPS ist inaktiv mit 2-Hydroxybenzoyl-CoA, 4-Hydroxybenzoyl-CoA, Cinnamoyl-CoA, 4-Hydroxycinnamoyl-CoA und Acetyl-CoA.



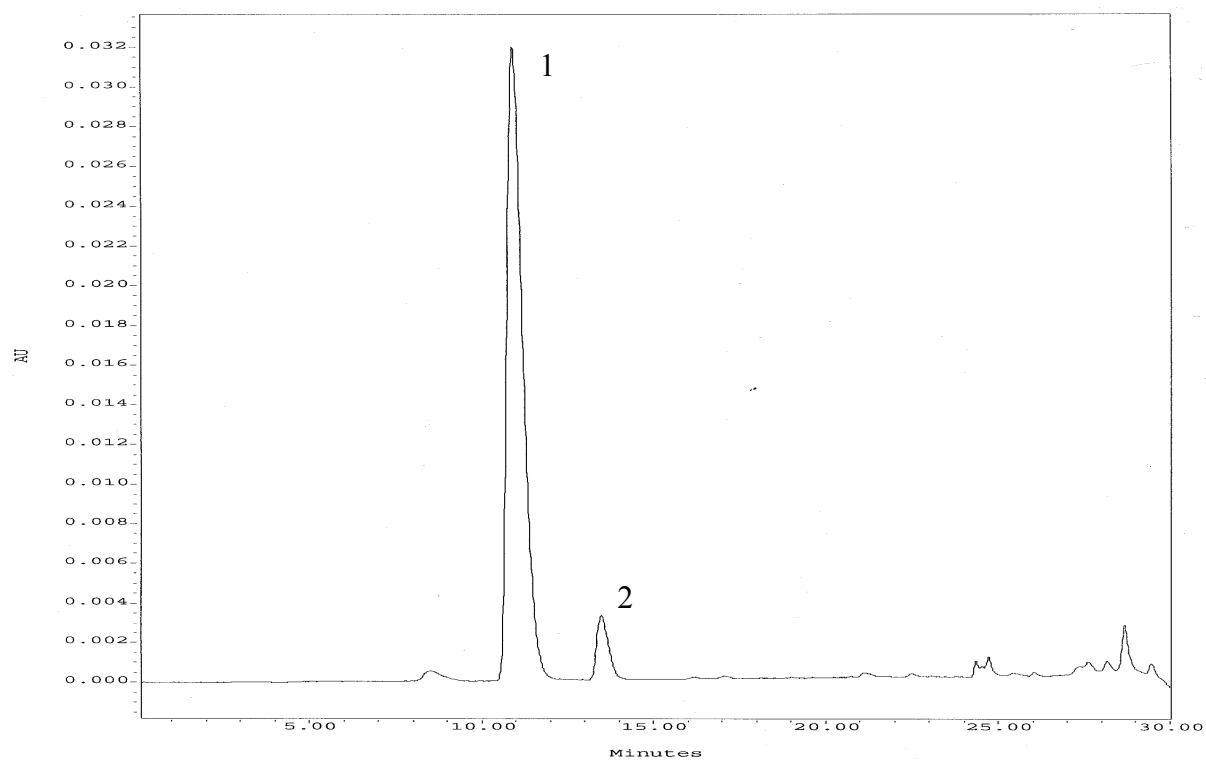


Abbildung 13: HPLC-Analyse einer Inkubation von Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA mit Wild-Typ-BPS

1: 2,4,6-Trihydroxybenzophenon

2: 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on

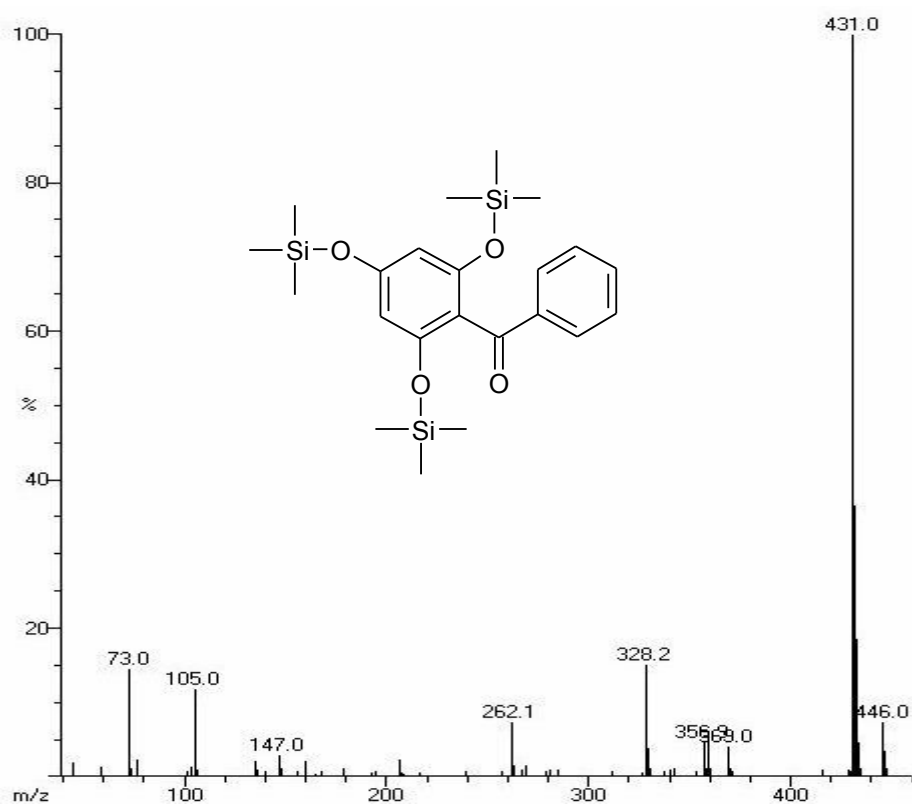


Abbildung 14: MS-Spektrum von 2,4,6-Tri-(trimethylsiloxy)-benzophenon ( $M_R=446$ , RI (ZB-1)=2204, RI (HP-5)= 2240)

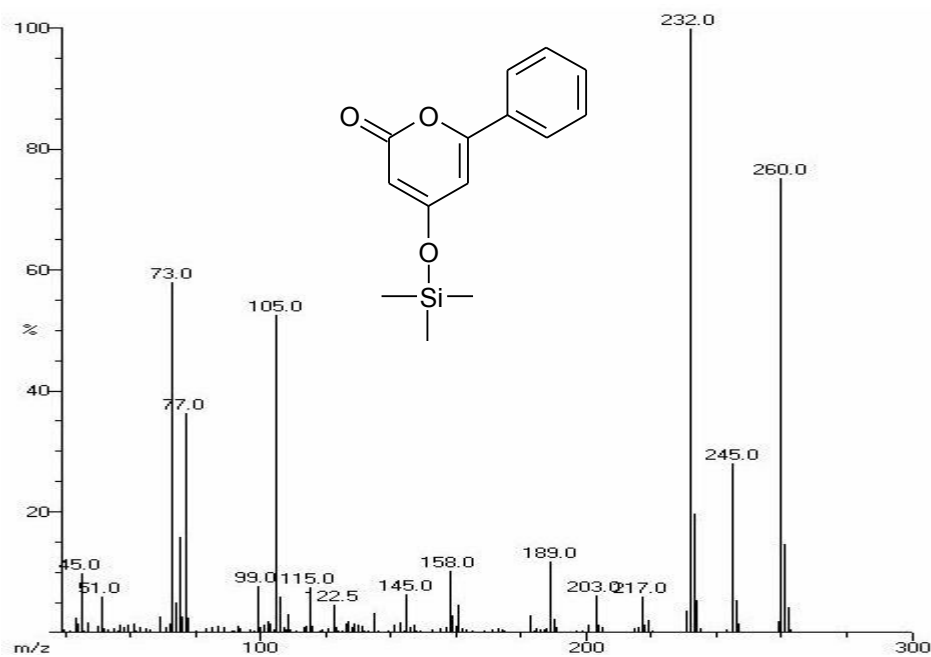


Abbildung 15: MS-Spektrum von 4-Trimethylsiloxy-6-phenylpyran-2-on ( $M_R=260$ , RI (ZB-1)=2065, RI (HP-5)=2135)

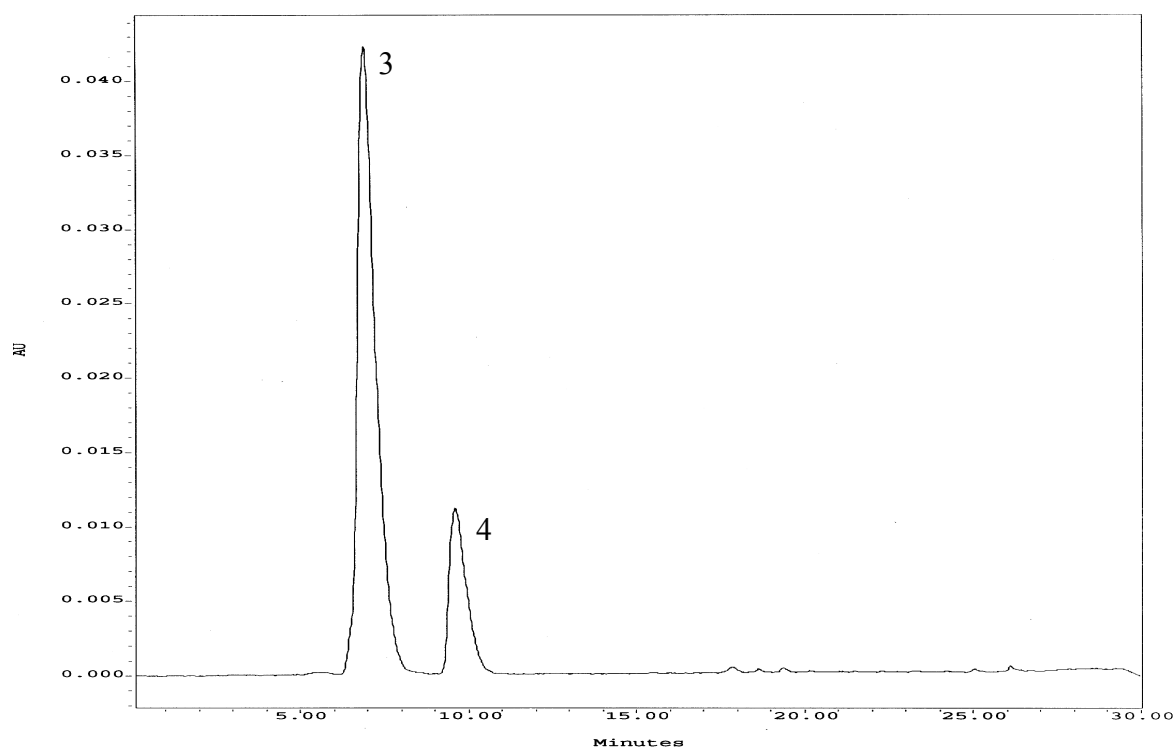


Abbildung 16: HPLC-HPLC-Analyse einer Inkubation von 3-Hydroxybenzoyl-CoA und Malonyl-CoA mit Wild-Typ-BPS; 3: 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon

4: 4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on

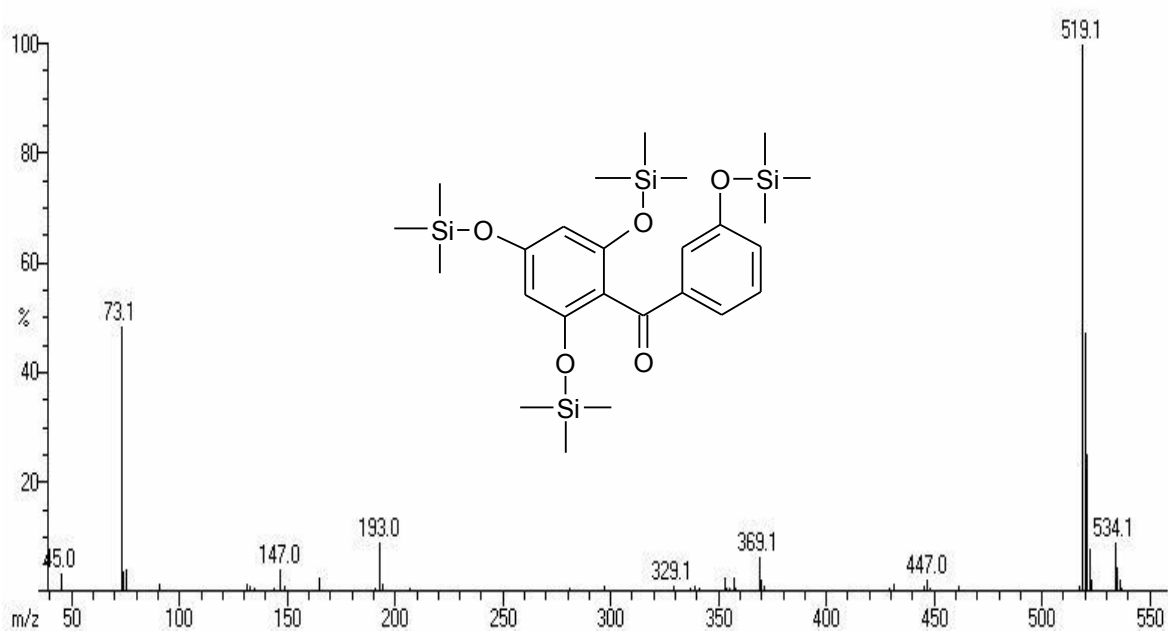


Abbildung 17: MS-Spektrum von 2,3',4,6-Tetra-(trimethylsiloxy)-benzophenon ( $M_R=534$ , RI (HP-1)= 2418)

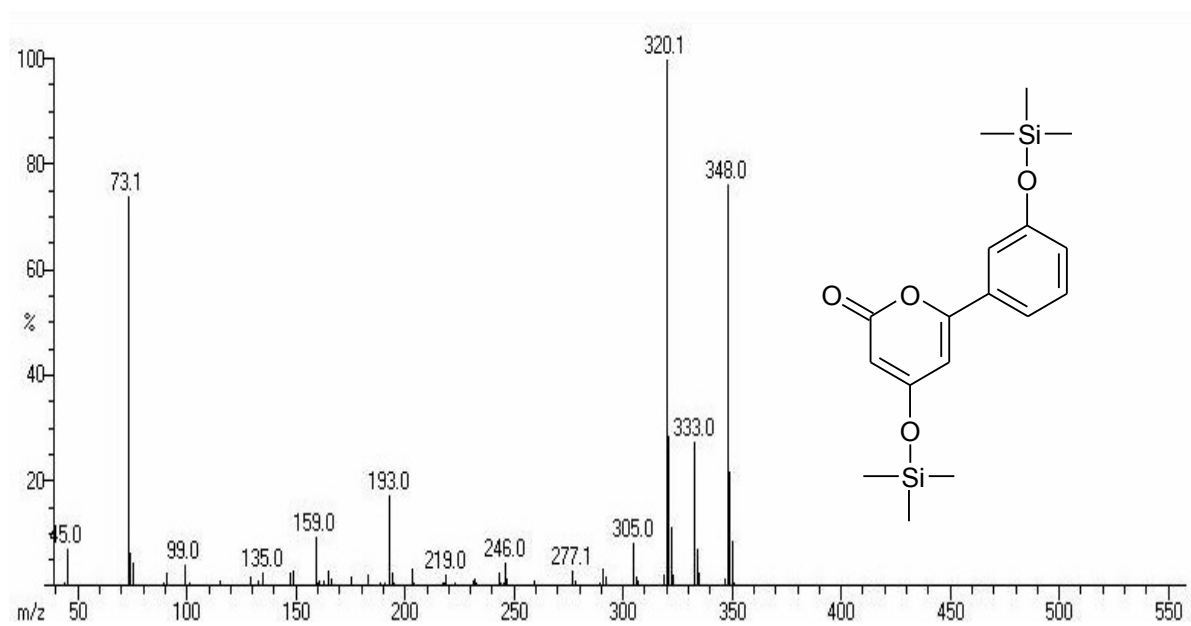


Abbildung 18: MS-Spektrum von 4-Trimethylsiloxy-6-(3'-trimethylsiloxy)-phenylpyran-2-on ( $M_R=348$ ,  
 $RI (HP-5)=2436$ )

## 4.2 Ergebnisse der Homologie-Modellierung

In dieser Arbeit wird die BPS-Aminosäure-Sequenz anderen homologen Polyketidsynthasen gegenüber gestellt. Nachdem die Aminosäuresequenzen der CHS von *Medicago sativa* und der BPS von *Hypericum androsaemum* verglichen wurden (Sequenzidentität 59,1 %), wird mit Hilfe des Web-Service von Swiss-Model ([www.swiss-modell.com](http://www.swiss-modell.com)) ein Strukturmodell (1.4) auf der Basis der CHS-Röntgenstruktur (1cgz) im Komplex mit dem Inhibitor Resveratrol berechnet. Zum besseren Verständnis wird die Kristallstruktur der CHS neben dem Homologiemodell der BPS dargestellt (Abb. 19 und 20). In der  $\beta$ -Faltblatt- $\alpha$ -Helix-Strukturdarstellung erkennt man die Ähnlichkeit des Faltungsmusters der beiden Enzyme.

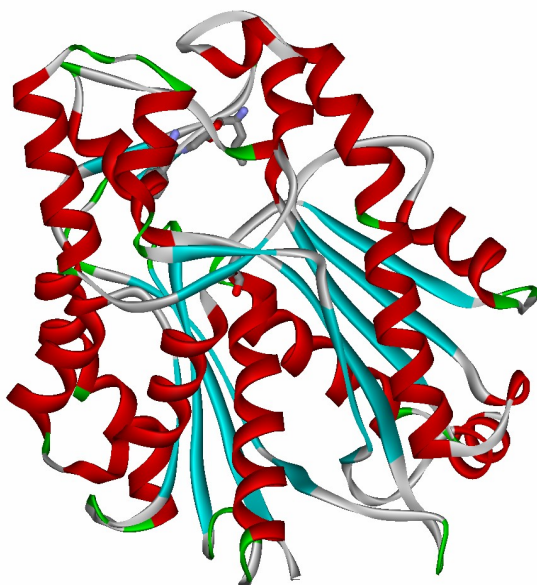


Abbildung 19: Kristallstruktur der CHS von *M. sativa*

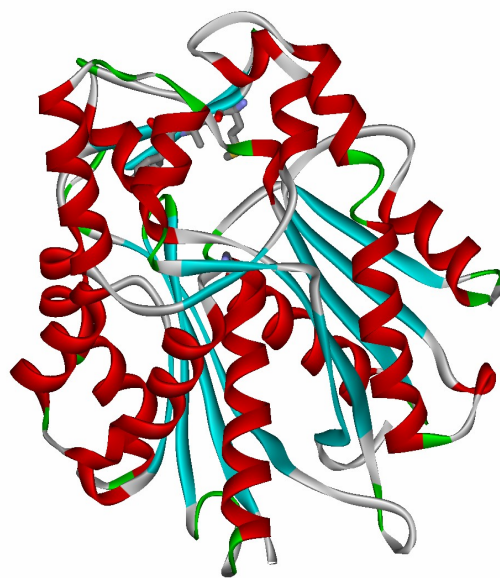


Abbildung 20: Modell der BPS von *H. androsaemum*

Dies ermöglicht einen Vergleich des aktiven Zentrums der BPS mit dem der CHS, um eventuelle Funktionen der einzelnen Aminosäuren der BPS zuzuordnen. Das aktive Zentrum der CHS besteht aus drei Bereichen: Zunächst die katalytische Triade, die in allen Polyketidsynthasen Typ III vorkommt (1.1) und die Aminosäuren Histidin 303, Asparagin 336 und Cystein 164 umfasst. Ein weiterer Teil des aktiven Zentrums ist die so genannte Initiationstasche. Sie besteht aus vier Aminosäuren: Leucin 214, Isoleucin 254, Glycin 256 und Phenylalanin 265. Der größte Teil der aktiven Tasche besteht aus acht Aminosäuren: Threonin 132, Serin 133, Threonin 194, Valin 196, Threonin 197, Glycin 216, Leucin 263 und Serin 338. Hier findet

die Kettenverlängerung statt, weshalb sie Elongationstasche genannt wird. Die Nummerierungen beziehen sich alle auf die CHS. Durch den Vergleich der Enzymstruktur der CHS mit der modellierten Struktur der BPS können Rückschlüsse auf die sich im aktiven Zentrum der BPS befindlichen Aminosäuren gezogen werden. Die katalytische Triade der BPS besteht aus Histidin 307, Asparagin 340 und Cystein 167, die im Computermodell korrekt positioniert werden können. Im Computermodell stellt sich die Initiationstasche so dar, dass sie aus Methionin 217, Isoleucin 258, Alanin 260 und Tyrosin 269 gebildet wird. Zu den 8 Aminosäuren der Elongationstasche gehören folgende Reste: Threonin 135, Serin 136, Threonin 197, Methionin 199, Threonin 200, Serin 219, Methionin 267 sowie Glycin 342. Nachfolgend werden in Tabelle 4 die Aminosäuren und deren Positionen in der Initiations- und Elongationstasche sowie in der katalytischen Triade der CHS und BPS gegenüber gestellt.

Tabelle 4: Vergleich der Aminosäuren der aktiven Zentren von CHS und BPS

<b>CHS <i>Medicago sativa</i></b>	<b>BPS <i>Hypericum androsaemum</i></b>
<b>Initiationstasche</b>	<b>Initiationstasche</b>
Leucin 214	Methionin 217
Isoleucin 254	Isoleucin 258
Glycin 256	Alanin 260
Phenylalanin 265	Tyrosin 269
<b>Elongationstasche</b>	<b>Elongationstasche</b>
Threonin 132	Threonin 135
Serin 133	Serin 136
Threonin 194	Threonin 197
Valin 196	Methionin 199
Threonin 197	Threonin 200
Glycin 216	Serin 219
Leucin 263	Methionin 267
Serin 338	Glycin 342
<b>Katalytische Triade</b>	<b>Katalytische Triade</b>
Cystein 164	Cystein 167
Histidin 303	Histidin 307
Asparagin 336	Asparagin 340

Die 15 Aminosäuren des aktiven Zentrums der BPS wurden in Abb. 21 räumlich dargestellt. Mit Hilfe des Programms Moloc wird zusätzlich das Starter-Substrat Benzoyl-CoA mit in die Bindetasche hinein modelliert. Die Initiationstasche ist pink, die Elongationstasche grün eingefärbt. Die drei Aminosäuren der katalytischen Triade sind schwarz beschriftet.

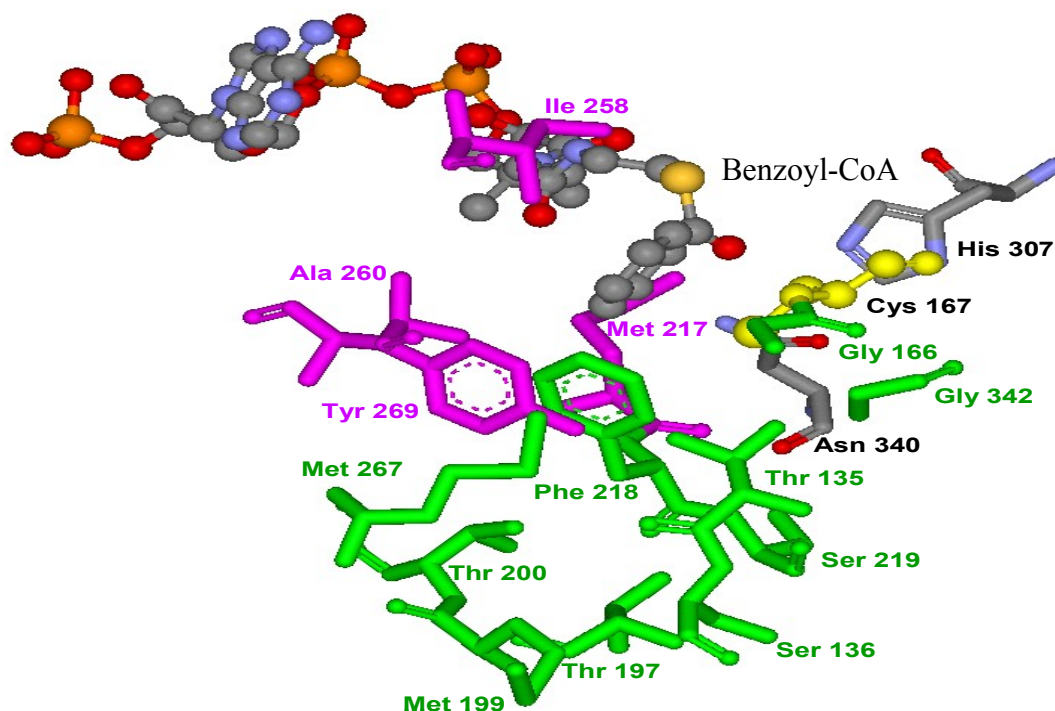


Abbildung 21: Aktives Zentrum der BPS mit eingelagertem Benzoyl-CoA

### 4.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten von BPS-Mutanten

Um die Modellierungsergebnisse experimentell zu bestätigen und die Auswirkungen von Einzel- und Mehrfach-Mutationen auf die Substrat- und Produktspezifität der BPS zu prüfen, werden die erzeugten Enzym-Mutanten mit verschiedenen Starter-Substraten inkubiert und ihre Produktbildung qualitativ wie quantitativ analysiert.

#### 4.3.1 Einzelmutationen der BPS in Richtung CHS

Liu et al. (2003) berichten, dass die CHS von *H. androsaemum* durch eine Dreifach-Mutation in eine BPS überführt wurde, die allerdings im Vergleich zur Wild-Typ-BPS eine geringere

katalytische Effizienz aufweist. Daraus ergibt sich die Frage, ob umgekehrt die BPS in eine CHS überführbar ist. Dafür werden zunächst alle Aminosäuren der BPS, die im aktiven Zentrum nicht mit denen der CHS übereinstimmen, ausgetauscht (Tabellen 5 und 6). Die resultierenden Enzym-Mutanten werden mit verschiedenen Starter-Substraten inkubiert, wobei das Augenmerk auf Benzoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA als den bevorzugten Startern der BPS und 4-Cumaroyl-CoA und Cinnamoyl-CoA als den bevorzugten Startern der CHS liegt.

*Tabelle 5: Mutationen in der Initiationstasche der BPS und ihre Auswirkung auf die Spezifität*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>	<b>4-Cumaroyl-CoA</b>	<b>Cinnamoyl-CoA</b>
M217L	Wächst nach dem Animpfen in LB-Medium nicht				
A260G		Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	keine Aktivität
Y269F		Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	keine Aktivität

*Tabelle 6: Mutationen in der Elongationstasche der BPS und ihre Auswirkung auf die Spezifität*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>	<b>4-Cumaroyl-CoA</b>	<b>Cinnamoyl-CoA</b>
M199V		Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	keine Aktivität
M267L		Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	keine Aktivität
G342S		Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	keine Aktivität
S219A		Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	keine Aktivität

Die Position S219 in der BPS ist nicht zu Glycin mutiert worden, wie es an der selben Stelle in der CHS vorliegt. Das Computermode ll lässt die Vermutung zu, dass eine höhere Aktivität resultiert, wenn an dieser Position eine CH<sub>3</sub>-Gruppe eingeführt und Serin gegen Alanin ausgetauscht wird. Alanin entspricht auch der Aminosäure, die sich in dieser Position in der ACS



von *Ruta graveolens* befindet. Allerdings ist bei der S219A-Mutante keinerlei Aktivitätsänderung detektierbar.

### 4.3.2 Mehrfachmutationen der BPS in Richtung CHS

Um festzustellen, ob eventuell durch die Kombinationen von Einzelmutationen Spezifitätsänderungen hervorgerufen werden können, werden Mehrfach-Mutationen durchgeführt.

Die Positionen, die von Liu et al. (2003) in der CHS mutiert wurden, sind L263, F265, S338 und G256 (Nummerierung nach CHS von *H. androsaemum*). Sie entsprechen nach der Zählweise der BPS den Positionen M267, Y269, G342 bzw. A260. Des Weiteren wird neben diesen Aminosäuren noch die Position L214 der CHS mit einbezogen. Sie entspricht der Position M217 in der BPS. Im ComputermodeLL scheint diese Position in der Initiationstasche von Bedeutung für die Substratselektivität zu sein. Die Kombinationen von Mutationen an der BPS sind in den Tabellen 7 - 10 aufgeführt.

Tabelle 7: Doppelmutationen der BPS und ihre Auswirkung auf die Spezifität

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>	<b>4-Cumaroyl-CoA</b>	<b>Cinnamoyl-CoA</b>
M267L / Y269F		Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
A260G / G342S	keine Aktivität				

Tabelle 8: Tripelmutationen der BPS und ihre Auswirkung auf die Spezifität

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>	<b>4-Cumaroyl-CoA</b>	<b>Cinnamoyl-CoA</b>
M217L / M267L / Y269F	Wächst nach dem Animpfen in LB-Medium nicht				
A260G / M267L / Y269F		Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	keine Aktivität
M267L / Y269F / G342S	keine Aktivität				

Tabelle 9: Vierfach-Mutationen der BPS und ihre Auswirkung auf die Spezifität

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>	<b>4-Cumaroyl-CoA</b>	<b>Cinnamoyl-CoA</b>
A260G / M267L / Y269F / G342S	keine Aktivität				
M217L / A260G / M267L / Y269F	Wächst nach dem Animpfen in LB-Medium nicht				
M217L / M267L / Y269F / G342S	Wächst nach dem Animpfen in LB-Medium nicht				

Tabelle 10: Fünfach-Mutation der BPS und ihre Auswirkung auf die Spezifität

Mutante	Bemerkung	Benzoyl-CoA	3-OH-Benzoyl-CoA	4-Cumaroyl-CoA	Cinnamoyl-CoA
M217L / A260G / M267L / Y269F / G342S	Wächst nach dem Animpfen in LB-Medium nicht				

### 4.3.3 Einzelmutationen der BPS in Richtung ACS

Bei dem Vergleich der Aminosäuren von Initiations- und Elongationstasche der BPS mit anderen Enzymen ist die Acridonsynthase (1.1.6) hervorzuheben.

Dieses Enzym hat als bevorzugtes Substrat N-Methylantraniloyl-CoA, das also in *ortho*-Position einen Substituenten trägt. Da die BPS keine Aktivität mit *ortho*-substituierten Substraten wie beispielsweise dem 2-Hydroxybenzoyl-CoA besitzt und sich die ACS nur in wenigen Aminosäuren im aktiven Zentrum von der BPS unterscheidet, wird die BPS durch entsprechende Mutationen in Richtung ACS verändert.

Folgende Aminosäuren werden ausgetauscht:

T135S, S136A, S219A und G342S in der Elongationstasche sowie A260G und Y269V in der Initiationstasche.

Die resultierenden BPS-Mutanten werden mit Benzoyl-CoA, 2-Hydroxybenzoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA inkubiert und ihre Produktbildung analysiert (Tabelle 11)

Tabelle 11: Einzelmutationen der BPS in Richtung ACS und ihre Wirkung

Mutation	Bemerkung	Benzoyl-CoA	2-OH-Benzoyl-CoA	3-OH-Benzoyl-CoA
S136A	keine Aktivität			
T135S		Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität	keine Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität

<b>Mutation</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>2-OH-Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
S219A		Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität	keine Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität
A260G	siehe Mutation zur CHS	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ
Y269V		Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität	keine Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, nur mit geringerer Aktivität
G342S	siehe Mutation zur CHS	Entspricht dem Wild-Typ	keine Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ

#### 4.3.4 Mehrfachmutationen der BPS in Richtung ACS

Weiterhin werden Doppel-, Tripel- und eine Vierfach-Mutation durchgeführt:

*Tabelle 12: Doppel-, Tripel- und eine Vierfach-Mutation der BPS in Richtung ACS*

<b>Mutation</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>2-OH-Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
T135S / S136A	keine Aktivität			
A260G / G342S	keine Aktivität; siehe Mutation zur CHS			
T135S / S136A / A260G	keine Aktivität			
T135S / S136A / A260G / G342S	keine Aktivität			

Auch mit den darüber hinaus eingesetzten Ausgangssubstraten (3.6.2) besitzen die Mutanten keinerlei Aktivität. Zusätzlich werden Inkubationen mit N-Methylantraniloyl-CoA durchgeführt. Wie von Liu et al. (2003) beschrieben, besitzt der BPS-Wild-Typ eine geringe Aktivität

mit diesem Starter-Substrat. Mit den Mutanten wird keine Aktivität mit N-Methylanthranyloyl-CoA beobachtet.

#### 4.3.5 Einzelmutationen der BPS in Richtung 2-PS

Aus den Arbeiten von Jez et al. (2000) geht hervor, dass durch eine Tripelmutation der CHS von *Medicago sativa* eine 2-PS gebildet wird, wie sie in *Gerbera hybrida* vorkommt. Jede Einzelmutation der CHS zeigt bereits eine hohe Aktivität mit Acetyl-CoA als dem bevorzugten 2-PS-Substrat bei der Entstehung von 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron. Da die BPS und die CHS keinerlei Aktivität mit Acetyl-CoA aufweisen, werden an den Positionen, die in der CHS in Richtung 2-PS mutiert wurden, auch in der BPS Mutationen durchgeführt.

Es handelt sich um die Aminosäuren T200, A260 und G342, die durch Einzelmutation in L200, L260 und I342 umgewandelt werden.

Die BPS-Mutanten T200L sowie G342I entsprechen dem Wild-Typ. Es werden keinerlei Enzymaktivitäten mit Acetyl-CoA beobachtet. Die Mutante A260L ist auch mit Benzoyl-CoA inaktiv.

#### 4.3.6 Einzelmutationen der BPS in Richtung BIS

Es werden auch Vergleiche zwischen den Enzymen BPS von *H. androsaemum* und BIS von *Sorbus aucuparia* gezogen. Beide Enzyme bevorzugen als Starter-Substrat Benzoyl-CoA, besitzen also ähnliche Substratspezifität. Aber sie unterscheiden sich in ihrer Produktspezifität, da sie ein Benzophenon bzw. ein Biphenyl als Produkt freisetzen.

In der Initiationstasche sind folgende Mutationen an unterschiedlichen Aminosäuren vorgenommen worden (Tabelle 13):

*Tabelle 13: Einzelmutationen in der Initiationstasche der BPS in Richtung BIS*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
M217L	Wächst nach dem Animpfen in LB-Medium nicht		
I258V		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität

In der Elongationstasche werden folgende Mutationen eingeführt (Tabelle 14):

*Tabelle 14: Einzelmutationen in der Elongationstasche der BPS in Richtung BIS*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
T135A	keine Aktivität		
M199V	siehe auch Einzelmutationen der Chalkonsynthase	Entspricht dem Wild-Typ	Entspricht dem Wild-Typ
T200F	keine Aktivität		
S219A	siehe auch Einzelmutation der Acridonsynthase	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
M267F		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität

#### 4.3.7 Mutationen der BPS auf Basis des Homologie-Modells

Zusätzlich zu den Mutationen, die in Anlehnung an andere Polyketidsynthasen Typ III durchgeführt worden sind, werden auch Aminosäuren auf Grund der Auswertung des Computermodells ausgetauscht.

Folgende Mutationen der Initiationstasche werden durchgeführt (Tabelle 15):

*Tabelle 15: Auf Grund der Computermodellierung erstellte Einzelmutationen in der Initiationstasche*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
I258S		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
Y269A		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität

Folgende Mutationen der Elongationstasche werden durchgeführt (Tabelle 16):

*Tabelle 16: Aufgrund der Computermodellierung erstellte Einzelmutationen in der Elongationstasche*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
T135F		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
T135G	keine Aktivität		
T135I	keine Aktivität		
T135L		Neues Hauptprodukt: 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on; Nebenprodukt: 2,4,6-Trihydroxybenzophenon	Sehr geringe Aktivität; Produkt: 4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on
T135N	keine Aktivität		
T135V	keine Aktivität		
T135Y	keine Aktivität		
T197I	keine Aktivität		
M199L		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
T200A		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
T200C	keine Aktivität		
T200F	keine Aktivität		
G342A		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
G342F	keine Aktivität		
G342L	keine Aktivität		
G342N	keine Aktivität		
G342T	keine Aktivität		
G342Y	keine Aktivität		



Außer den oben aufgeführten Einzelmutationen werden die folgenden Doppelmutanten hergestellt (Tabelle 17):

*Tabelle 17: Auf Grund der Computermodellierung erstellte Doppelmutationen*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
M199V / T200F	keine Aktivität		
M217I / F218L	keine Aktivität		
Y269F / G342A		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
M267L / G342A	keine Aktivität		
T135A / A260G	keine Aktivität		
T200A / A260G		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
I258S / A260G	keine Aktivität		

Schließlich werden auf Basis des Homologie-Modells auch noch Mutationen an solchen Positionen vorgenommen, die nicht in der Initiationstasche oder Elongationstasche liegen (Tabelle 18):

*Tabelle 18: Auf Grund der Computermodellierung erstellte Mutationen, die weder in der Initiationstasche noch in der Elongationstasche liegen*

<b>Mutante</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	<b>3-OH-Benzoyl-CoA</b>
G214A		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
G214C	keine Aktivität		
F218L	keine Aktivität		
N282S		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
L377F	keine Aktivität		
L377G		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
L377S		Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität	Entspricht dem Wild-Typ, aber geringere Aktivität
L377T	keine Aktivität		

Alle hergestellten Plasmide werden wie in Abb. 22 dargestellt auf ihre korrekte Größe (3.12.3) untersucht. Die Abb. 22 zeigt einige Beispiele, wobei das Plasmid der Wild-Typ BPS als Referenz mit auf das Gel getragen wird.

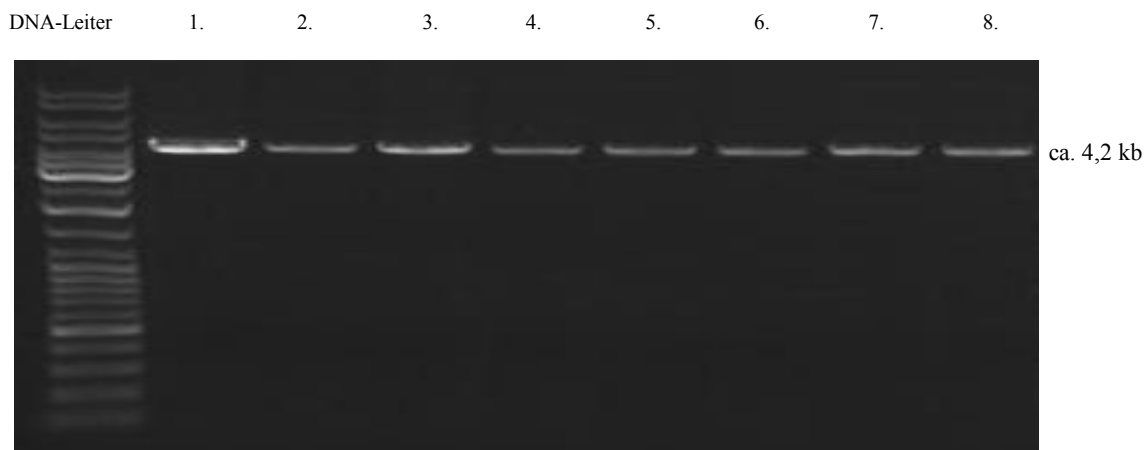


Abbildung 22: 1 %iges Agarose-Gel mit Plasmiden von: 1. BPS Wild-Typ, 2. BPS T135L, 3. BPS T135F, 4. BPS T200L, 5. BPS G342S, 6. BPS T135S/S136A, 7. BPS M217L, 8. BPS S219A (jeweils Vektor pRSet B)

Nach der Aufreinigung der exprimierten Proteine (3.4) werden die Enzyme auf ihre Reinheit durch ein SDS-Gel (3.8) überprüft. Abb. 23 zeigt hergestellte Enzymmutanten nach ihrer Aufreinigung mit Ni-NTA-Agarose (3.3.1.3). Als Referenz dient gereinigte Wild-Typ BPS.

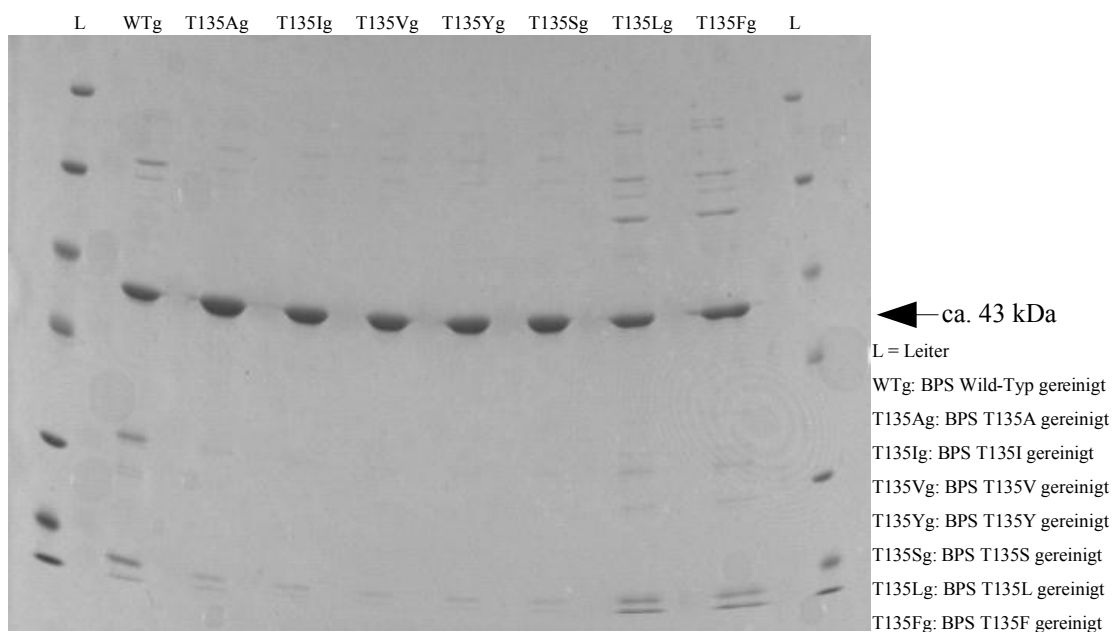


Abbildung 23: SDS-Gel mit gereinigtem Protein von BPS Wild-Typ und diversen BPS-Mutanten

## 4.4 Abschließender Vergleich der Mutanten mit Wild-Typ

Alle erzeugten BPS-Mutanten - ausgenommen die Mutante T135L - zeigen keine dramatische Änderung ihrer Substrat- bzw. Produktspezifität. Bei einer messbaren enzymatischen Aktivität weisen die jeweiligen HPLC-Chromatogramme das gleiche Peak-Muster wie der Wild-Typ auf. Allerdings kann aus den einzelnen Peakflächen geschlossen werden, dass viele Mutanten eine niedrigere Aktivität haben als der Wild-Typ. Diese Beobachtung basiert darauf, dass stets gleiche Mengen Protein mit identischen, sättigenden Konzentrationen Malonyl-CoA und Starter-Substrat inkubiert werden. Gleichzeitig sind die Versuchsbedingungen so gewählt, dass Temperatur und pH-Wert den in der Literatur (Liu et al., 2003) beschriebenen Optima entsprechen.

Eine deutliche Änderung der Spezifität ergibt sich für die BPS-Mutante T135L. Diese Mutante wird im Folgenden charakterisiert.

## 4.5 Charakterisierung des BPS Wild-Typs und der Mutante T135L

### 4.5.1 Spezifität

Im Gegensatz zum Wild-Typ ist bei Inkubation mit Benzoyl-CoA das Hauptprodukt der T135L-Mutante nicht das 2,4,6-Trihydroxybenzophenon (Peak 5), sondern das Lakton 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on (Peak 6) (Abb. 24). Das bedeutet eine dramatische Änderung der Produktspezifität. Dies gilt auch für das Starter-Substrat 3-Hydroxybenzoyl-CoA. Es entsteht nur noch eine geringe Menge an 4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on (Peak 7) und kein 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon mehr (Abb. 25; man beachte die geänderte Skalierung). Die Aktivität der Mutante mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA ist stark reduziert, was auch eine deutliche Änderung der Substratspezifität des Wild-Typs durch die T135L-Mutation bedeutet. Die Produktidentifizierungen erfolgten mittels GC-MS (3.2)

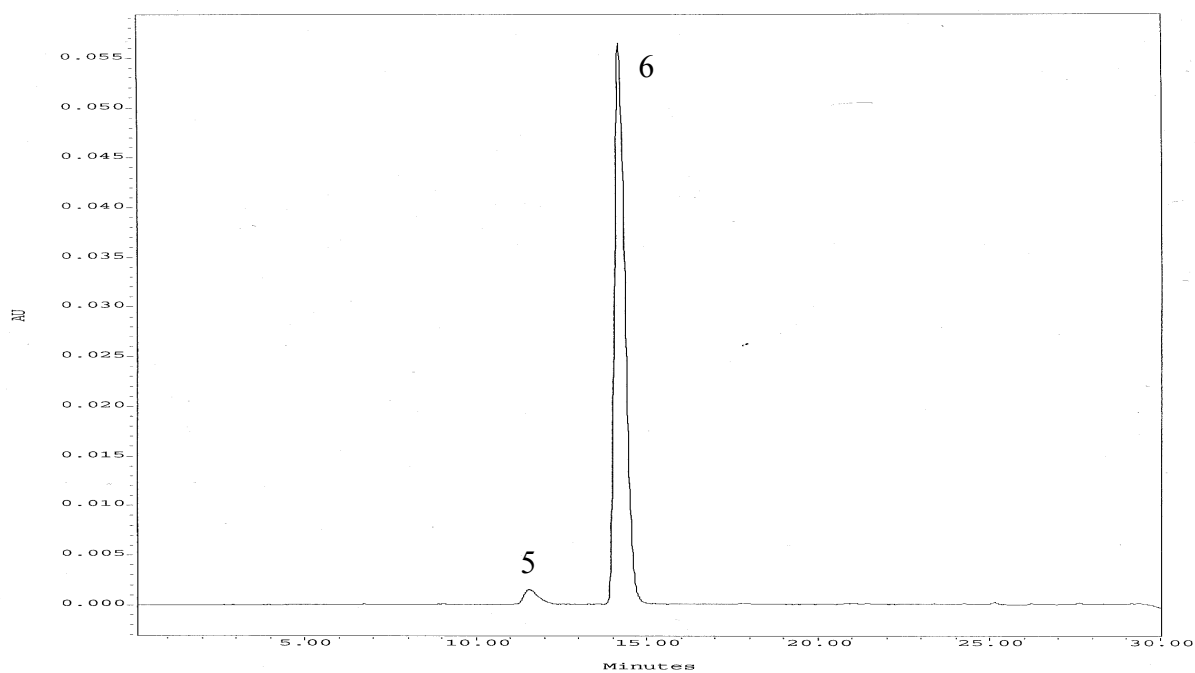


Abbildung 24: HPLC-Analyse einer Inkubation von BPS T135L mit Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA;  
5: 2,4,6-Trihydroxybenzophenon, 6: 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on

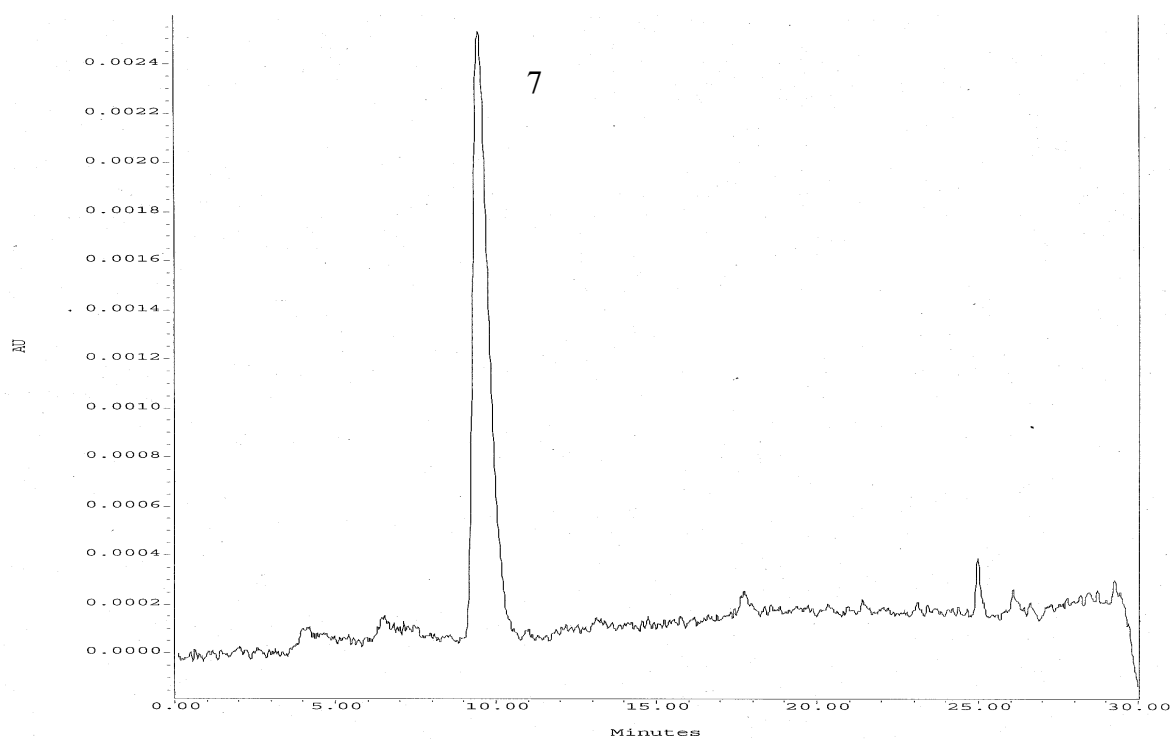


Abbildung 25: HPLC-Analyse der Inkubation von BPS T135L mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA und Malonyl-CoA;  
7: 4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on

### 4.5.2 Temperatur- und pH-Abhängigkeit

Die maximale Enzymaktivität der T135L-Mutante wird bei einem pH-Wert von 7,5 beobachtet (Abb. 26). Das Temperatur-Optimum liegt bei 35 - 40 °C (Abb. 27). Diese Daten entsprechen den ermittelten Resultaten für das Wild-Typ-Enzym (Liu et al., 2003). Die Produktmengen sind mittels HPLC-DAD ermittelt worden.

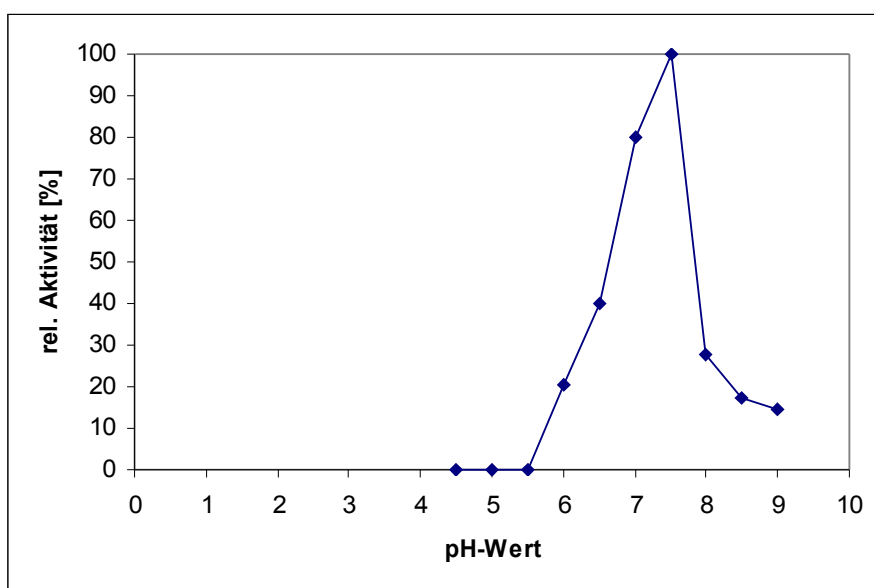


Abbildung 26: pH-Optimum der T135L-Mutante

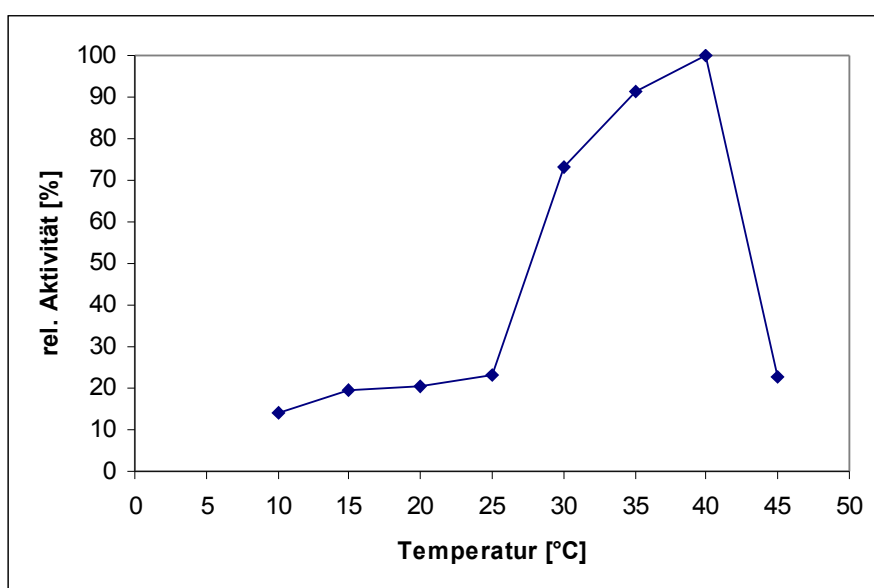


Abbildung 27: Temperatur-Optimum der T135L-Mutante

### 4.5.3 Kinetische Parameter

Um quantitative Aussagen über die Aktivität des Wild-Typ-Enzyms sowie der Mutante T135L machen zu können, werden nachfolgend die kinetischen Daten beider Enzyme bestimmt.

Für das bevorzugte Startersubstrat Benzoyl-CoA sowie den Kettenverlängerer Malonyl-CoA werden zunächst die  $K_m$ -Werte ermittelt. Dann folgt die Bestimmung der  $K_{cat}$ - und der  $K_{cat}/K_m$ -Werte.

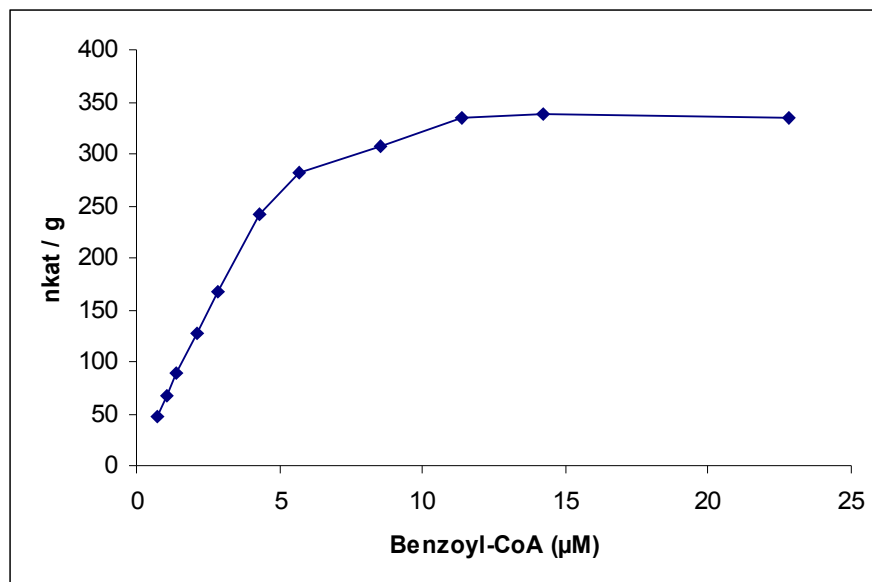


Abbildung 28: BPS Wild-Typ: Michaelis-Menten-Kinetik für Benzoyl-CoA

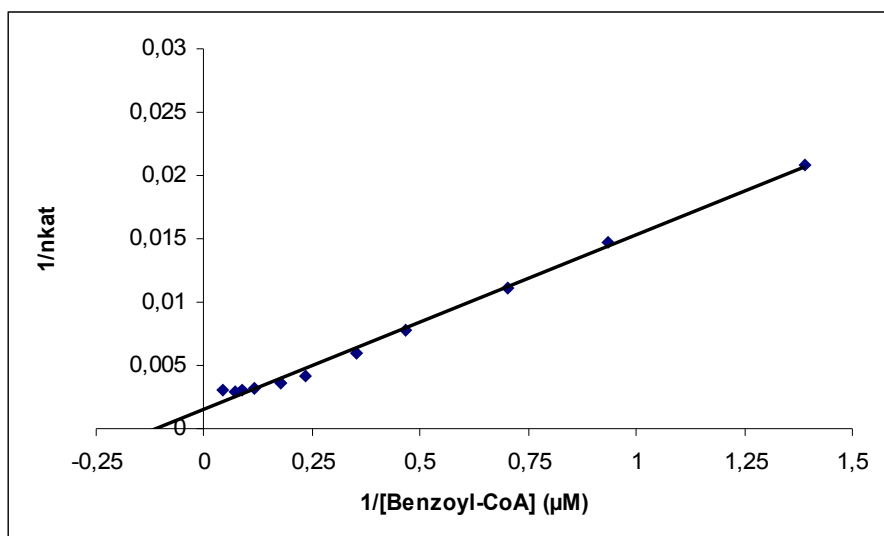


Abbildung 29: BPS Wild-Typ: Lineweaver-Burk-Kinetik für Benzoyl-CoA

Aus einer asymptotisch verlaufenden Kurve nach Michaelis-Menten (Abb. 28) lässt sich der  $K_m$ -Wert nur mit unzureichender Genauigkeit ablesen. Daher wird eine lineare Darstellung nach Lineweaver-Burk gewählt. Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ergibt sich für Benzoyl-CoA ein  $K_m$ -Wert von 8,6  $\mu M$  (Abb. 29). Der  $K_{cat}$ -Wert liegt bei 3,31/min. Daraus ergibt sich ein  $K_{cat}/K_m$ -Wert von 6414/M sec.

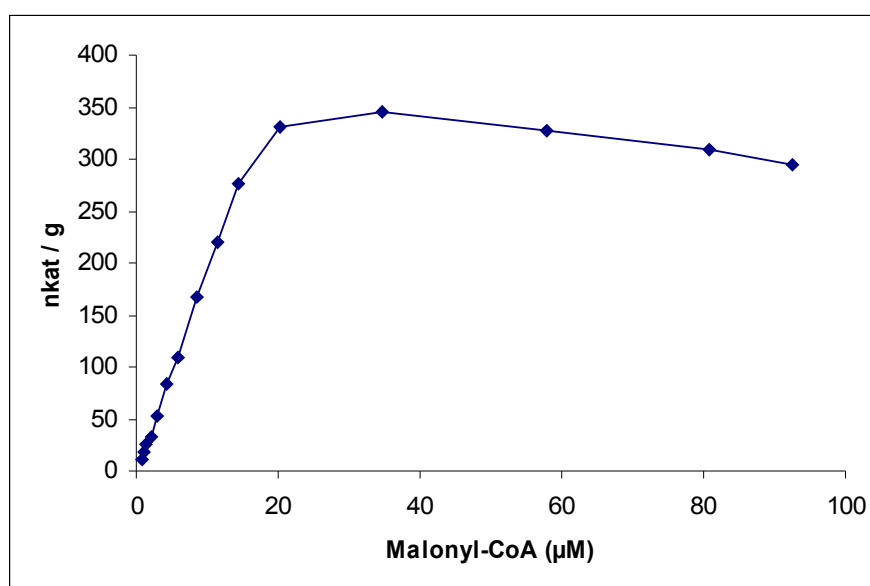


Abbildung 30: BPS Wild-Typ: Michaelis-Menten-Kinetik für Malonyl-CoA



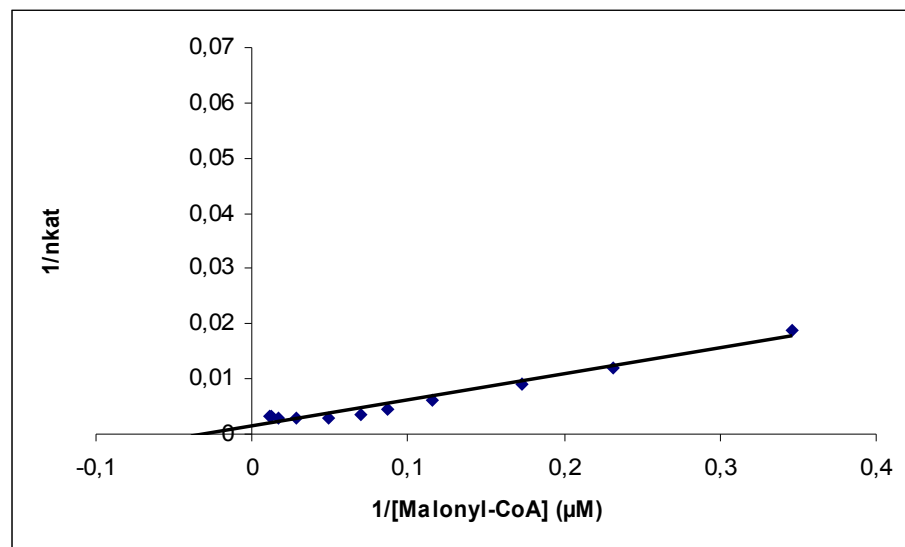


Abbildung 31: BPS Wild-Typ: Lineweaver-Burk-Kinetik für Malonyl-CoA

Für den Kettenverlängerer Malonyl-CoA ergibt sich nach Michaelis-Menten (Abb. 30) bzw. Lineweaver-Burk ein  $K_m$ -Wert von 31,3  $\mu\text{M}$  (Abb. 31). Der  $K_{\text{cat}}/K_m$ -Wert beträgt 1763/M sec.

Anschließend werden die  $K_m$ -,  $K_{\text{cat}}$ - und die  $K_{\text{cat}}/K_m$ -Werte für die Mutante T135L bestimmt.

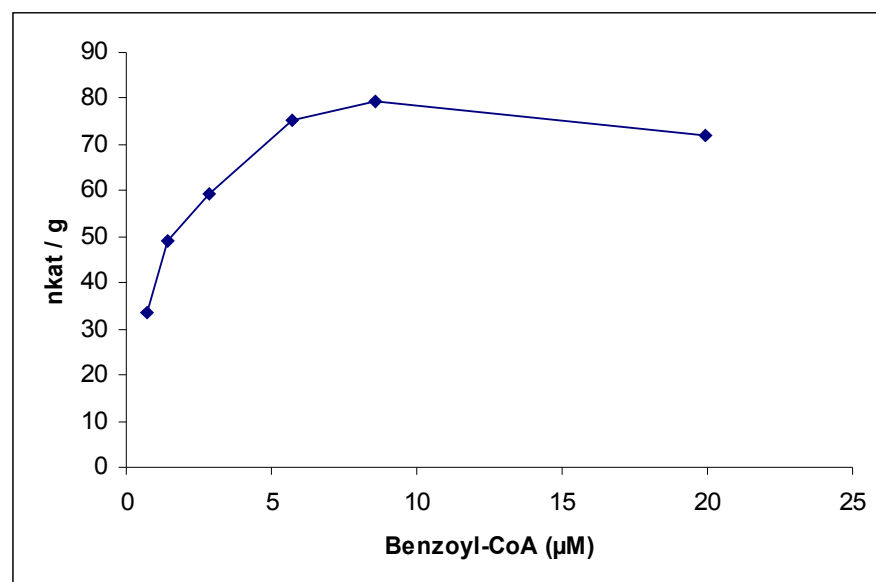


Abbildung 32: BPS T135L: Michaelis-Menten-Kinetik für Benzoyl-CoA

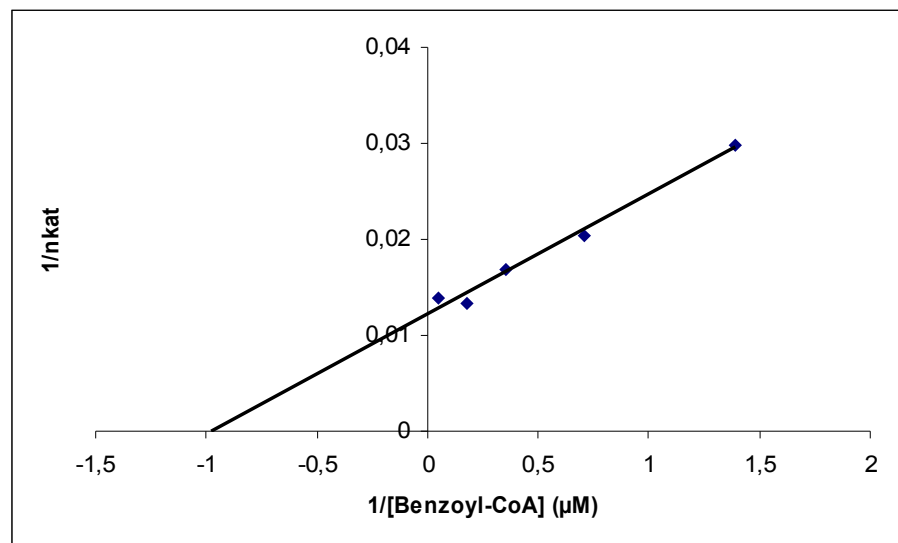


Abbildung 33: BPS T135L: Lineweaver-Burk-Kinetik für Benzoyl-CoA

Nach Michaelis-Menten bzw. Lineweaver-Burk ergibt sich für Benzoyl-CoA ein  $K_m$ -Wert von 1,0  $\mu\text{M}$  (Abb 32 und 33). Der  $K_{\text{cat}}$ -Wert beträgt 0,41/min. Aus diesen beiden Werten berechnet sich ein  $K_{\text{cat}}/K_m$ -Koeffizient von 6833/M sec.

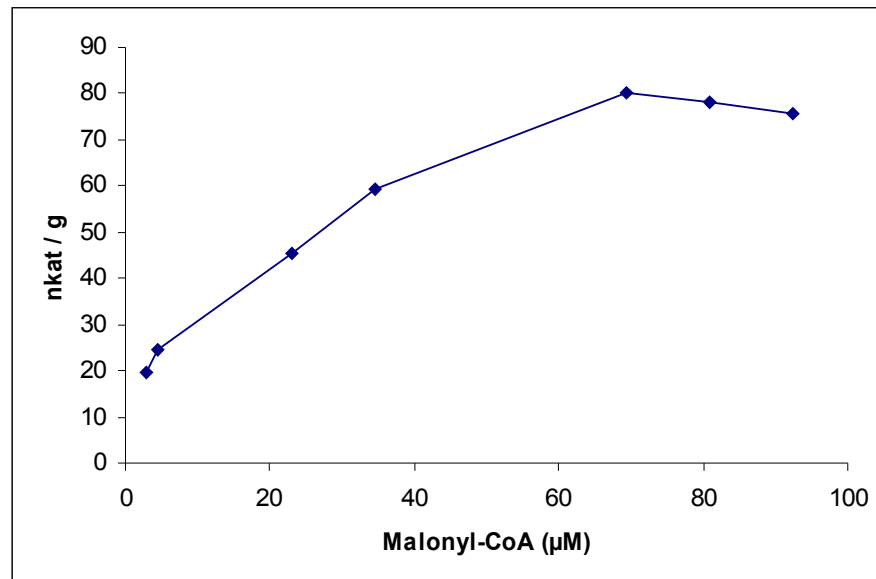


Abbildung 34: BPS T135L: Michaelis-Menten-Kinetik für Malonyl-CoA

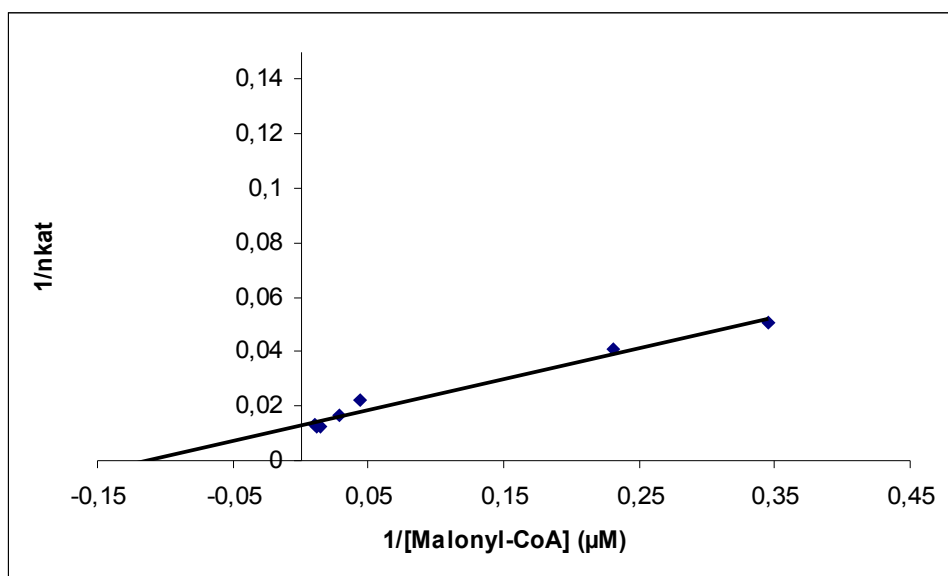


Abbildung 35: BPS T135L: Lineweaver-Burk-Kinetik für Malonyl-CoA

Für Malonyl-CoA ergibt sich nach Michaelis-Menten bzw. Lineweaver-Burk ein  $K_m$ -Wert von 8,7  $\mu\text{M}$  (Abb. 34 und 35). Daraus errechnet sich ein  $K_{\text{cat}}/K_m$ -Wert von 785/ $\text{M sec}$ .

In der nachfolgenden Tabelle 19 sind die kinetischen Eigenschaften zusammen gefasst.

Tabelle 19: Übersicht der kinetischen Daten

		$K_m [\mu\text{M}]$	$K_{\text{cat}} [\text{min}^{-1}]$	$K_{\text{cat}}/K_m [\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}]$
<b>BPS Wild-Typ</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	8,6	3,31	6414
<b>BPS Wild-Typ</b>	<b>Malonyl-CoA</b>	31,3		1763
<b>BPS T135L</b>	<b>Benzoyl-CoA</b>	1,0	0,41	6833
<b>BPS T135L</b>	<b>Malonyl-CoA</b>	8,7		785

Diese Ergebnisse sind für Enzyme detektiert worden, die als His-Tag-Proteine aus dem Vektor pRSet-B exprimiert wurden. Liu et al. (2003) ermittelte für BPS Wild-Typ als durch p-GEX-G-Vektor kodiertes GST-Fusionsprotein einen  $K_m$  für Benzoyl-CoA von 5,7  $\mu\text{M}$  und für Malonyl-CoA einen Wert von 23,1  $\mu\text{M}$ . Der  $K_{\text{cat}}$  beträgt bei Liu et al. (2003) 9,66  $\text{min}^{-1}$ . Daraus ergibt sich ein  $K_{\text{cat}}/K_m$  von 28345  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ . Der stimulierende Effekt des GST-Anteils auf die katalytische Effizienz ist reproduzierbar nachweisbar (Liu, persönliche Mitteilung).

Die Substratspezifität hat sich durch die Mutation T135L so geändert, dass die relative Aktivität mit *m*-Hydroxybenzoyl-CoA von 57,2 % auf 4,2 % abgesunken ist (Tabelle 20).

Tabelle 20: Substratspezifitäten des BPS Wild-Typs und der BPS-Mutante T135L [%]

Substrat	BPS Wild-Typ	BPS-Mutante T135L
Benzoyl-CoA	100	100
<i>m</i> -Hydroxybenzoyl-CoA	57,3	4,2

Liu et al. (2003) ermittelten für die Aktivität des aus dem p-GEX-G-Vektor expremierten BPS Wild-Typs ein Verhältnis von Benzoyl-CoA zu *m*-Hydroxybenzoyl-CoA von 100 zu 18,8. Im Gegensatz zeigt das in dieser Arbeit aus dem pRSet-B-Vektor expremierte Enzym ein Verhältnis von 100 zu 57,3.

## 4.6 Modellierung der BPS-Reaktionsintermediate

Ferrer et al. schlugen im Jahre 1999 einen Reaktionsmechanismus für die Verknüpfung von *p*-Cumaroyl-CoA mit drei Malonyl-CoA-Einheiten zum Naringenin-Chalkon in der Chalkonsynthese von *M. sativa* vor (Abb.36).

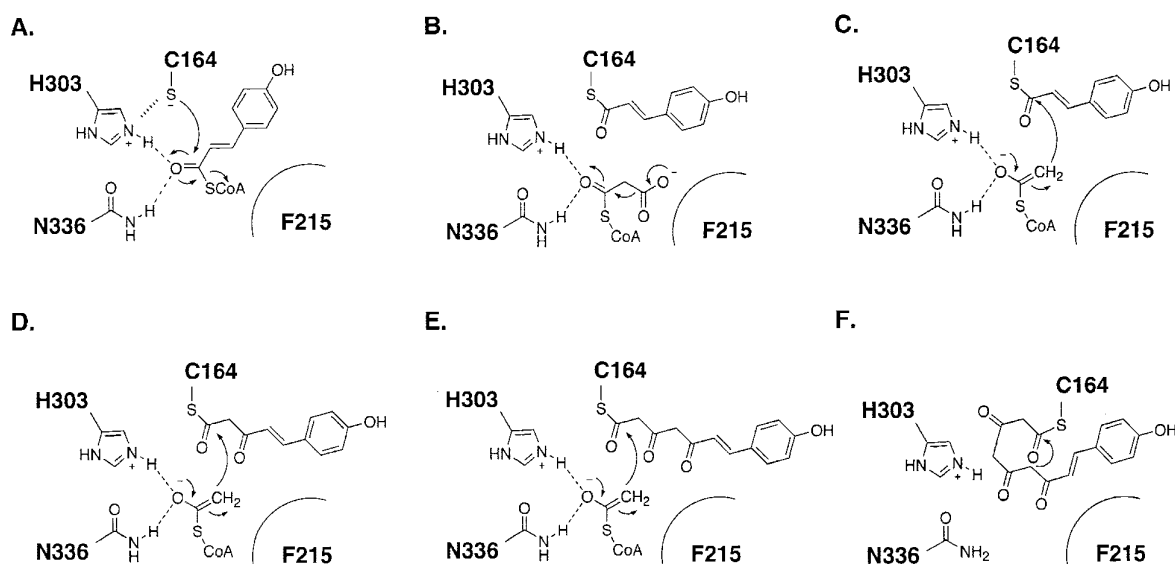


Abbildung 36: Möglicher Reaktionsmechanismus zur Entstehung von Naringenin-Chalkon in der CHS von *Medicago sativa* nach Ferrer et al. (1999)

Die Bezifferung der Aminosäuren entspricht der Nummerierung der CHS von *M. sativa*. Phenylalanin 215 wird von Jez et al. (2002) als eine der Aminosäuren angenommen, die einen wesentlichen Anteil an der Substratspezifität der CHS ausmachen.

Da das Computermodell der BPS auf der Struktur dieser CHS basiert, wird der Ablauf der Reaktion auf die BPS mit dem Ausgangssubstrat Benzoyl-CoA übertragen und so die mögliche Reaktionssequenz in der BPS modelliert. Dabei werden, wie in Kapitel 4.2 erwähnt, zunächst die Aminosäuren des aktiven Zentrums der BPS durch das Homologiemodell auf der Basis der Kristallstruktur der CHS erfasst.

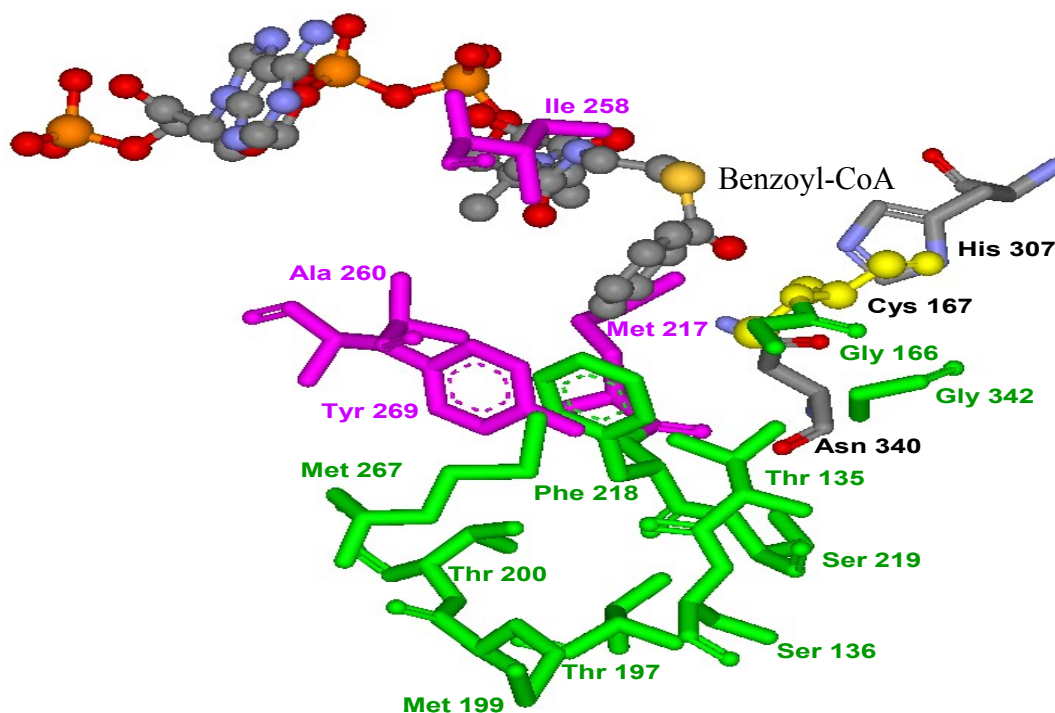


Abbildung 37: Aktives Zentrum der BPS mit eingelagertem Benzoyl-CoA

In dem Strukturmodell der BPS (Abb. 37) fällt auf, dass das Cystein 167 der katalytischen Triade (gelb hervorgehoben) sich in direkter räumlicher Nähe zum Benzoyl-Rest des Starter-CoAs befindet. Dies unterstreicht die Annahme von Ferrer et al. (1999), dass in allen Polyketidsynthasen Typ III die entscheidende Initiationsreaktion eine Verknüpfung des Starter-Substrats mit der SH-Gruppe des katalytischen Cysteins ist. Ferrer et al. (1999) postulierten

einen nucleophilen Angriff des Cysteins an die reaktive Carbonylgruppe des Substrats zu einem tetraedrischen Zwischenprodukt (Abb. 38).

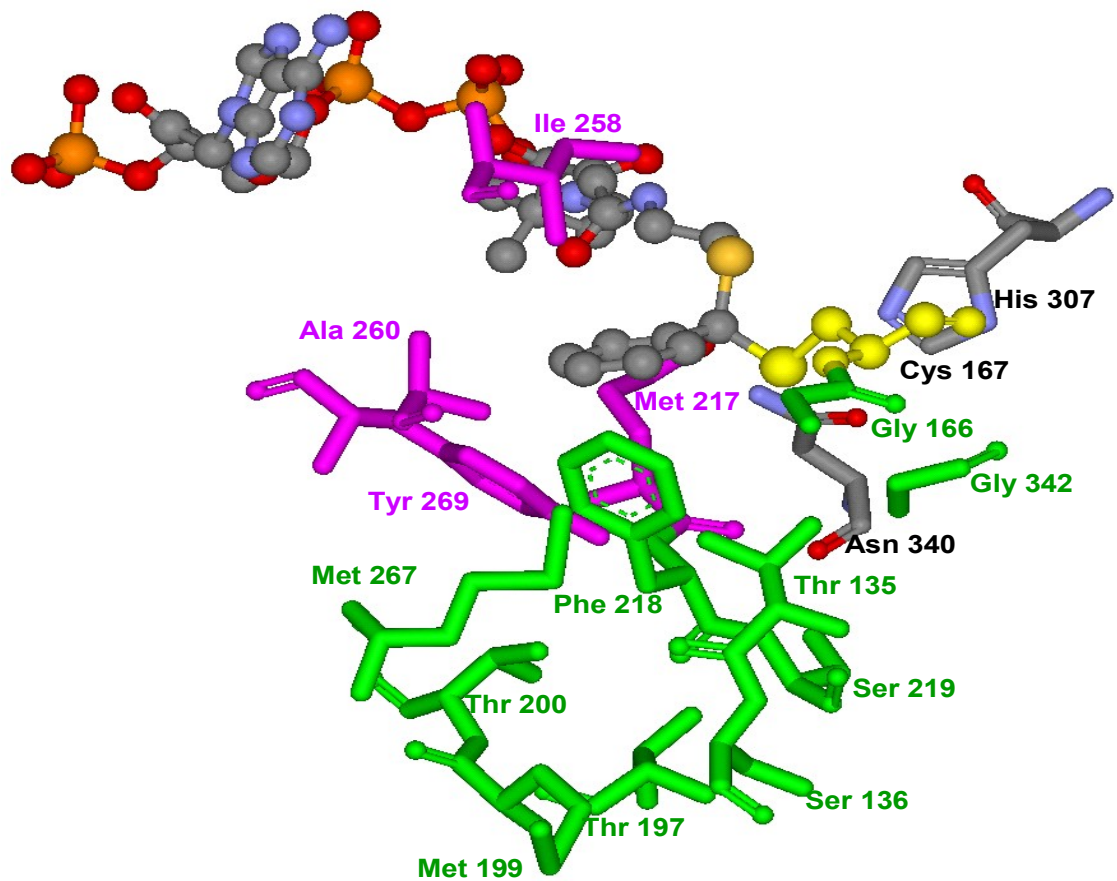


Abbildung 38: Verknüpfung von Benzoyl-CoA mit Cystein 167 zu einem tetraedrischen Zwischenprodukt.

Im zweiten Schritt der Reaktion wird das CoA vom Benzoyl-Rest gelöst und kann aus der Tasche hinaus diffundieren. Es entsteht das Monoketid, ein an Cystein 167 gebundener Benzoyl-Rest. Anschließend kann sich das erste Malonyl-CoA in die Tasche des aktiven Zentrums einlagern (Abb. 39).

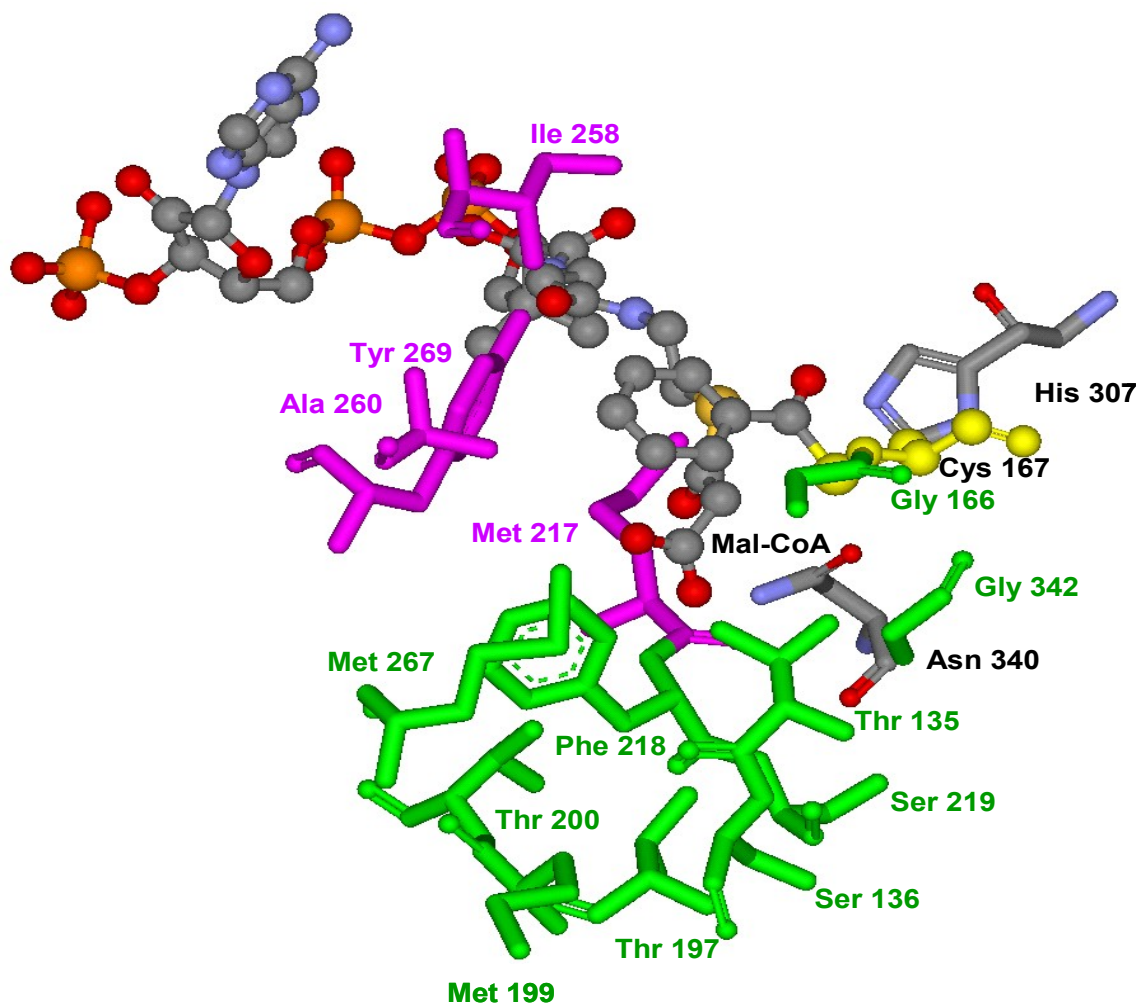


Abbildung 39: An das Cystein 167 gebundenes Monoketid sowie eingelagertes Malonyl-CoA

Nach dem gleichen Mechanismus entsteht ein Diketid durch Decarboxylierung des Malonyl-CoAs und anschließende Übertragung der C<sub>2</sub>-Einheit (Abb. 40).

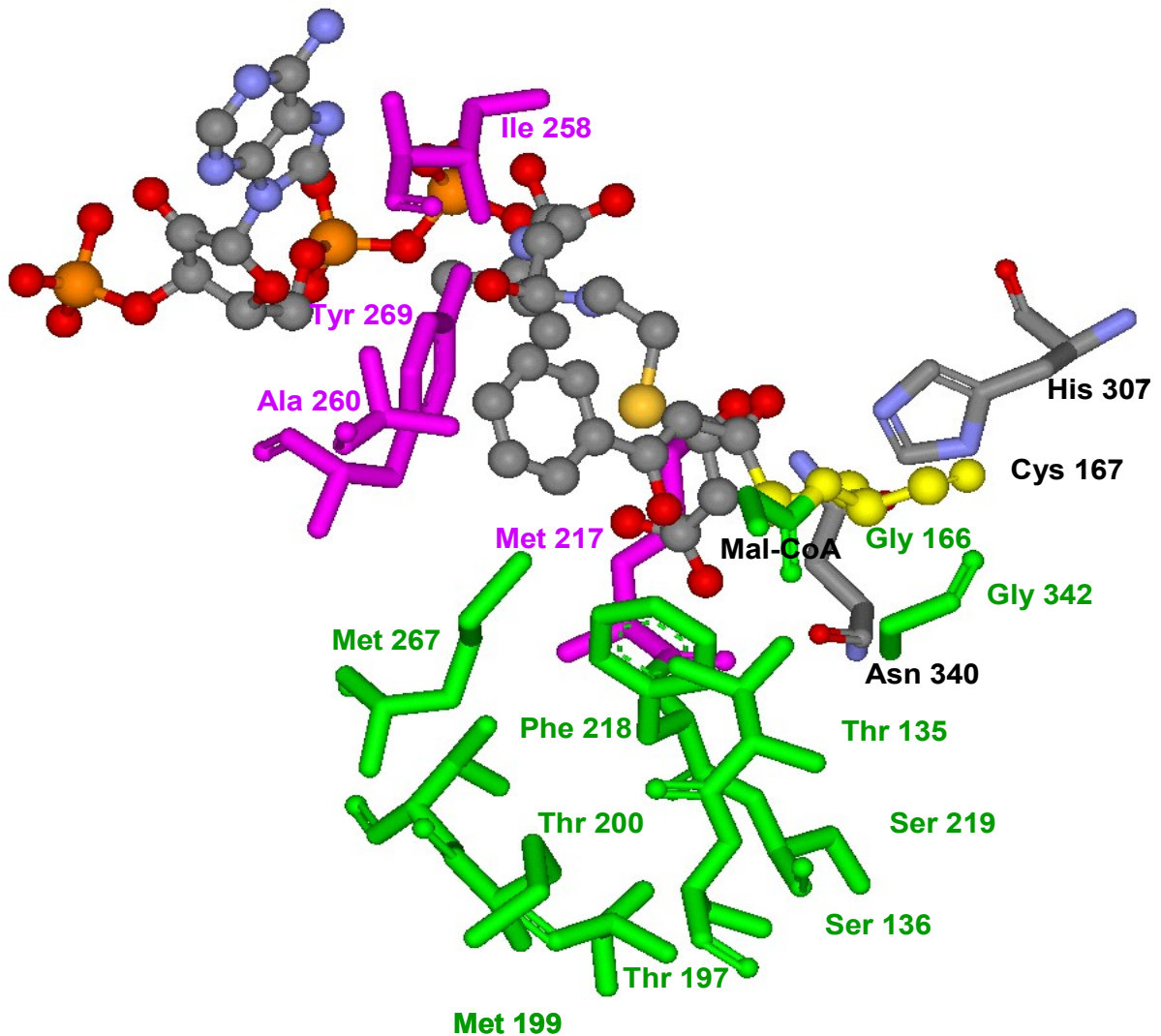


Abbildung 40: An das Cystein 167 gebundenes Diketid sowie eingelagertes Malonyl-CoA



Nach diesem Reaktionsschritt und dem Herausdiffundieren des freien CoAs kann ein weiteres Malonyl-CoA in die aktive Tasche eingelagert werden. Dadurch wird eine erneute Decarboxylierung des Kettenverlängerers ausgelöst und eine weitere C<sub>2</sub>-Einheit übertragen. Es entsteht ein Triketid (Abb. 41).

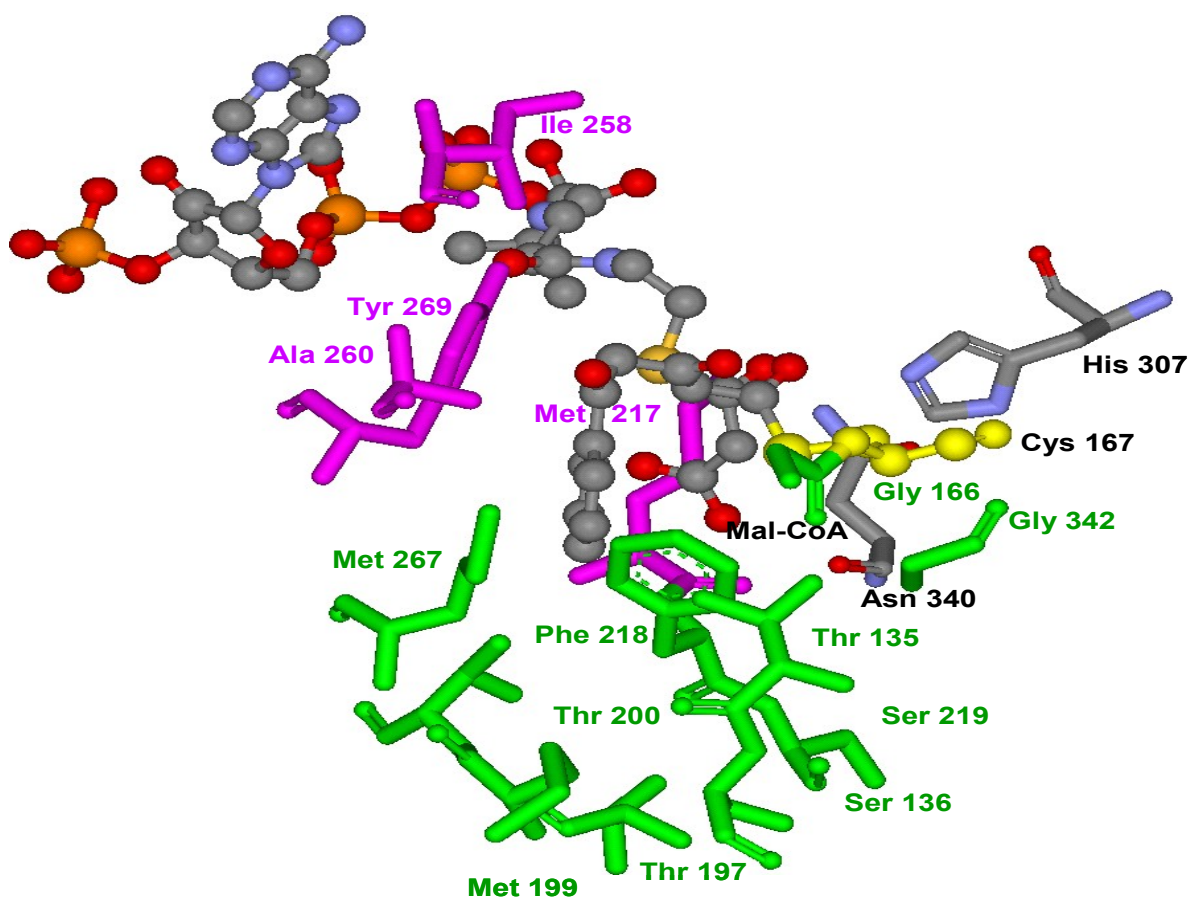


Abbildung 41: An das Cystein 167 gebundenes Triketid sowie eingelagertes Malonyl-CoA

Anschließend wiederholt sich diese Reaktion zum dritten Mal und führt zum Tetraketid (Abb. 42).

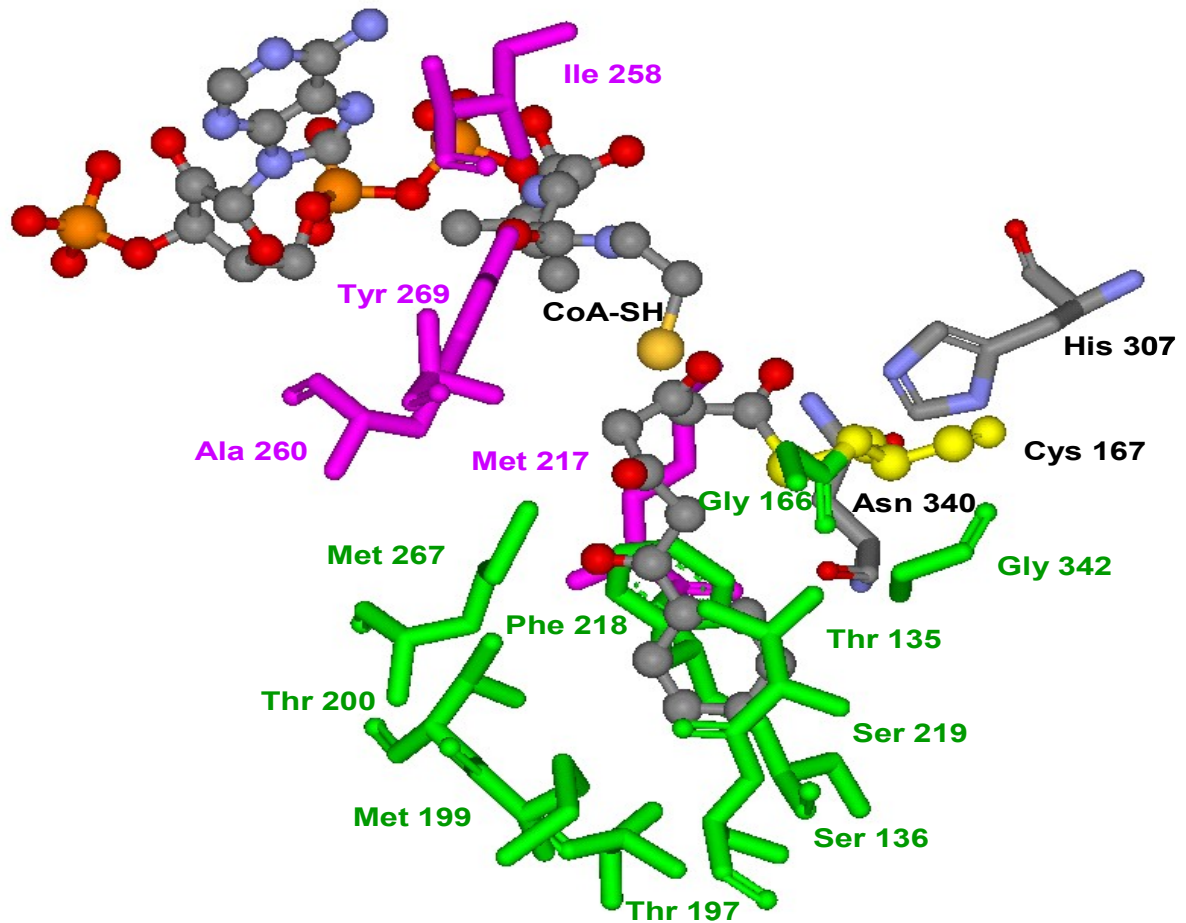


Abbildung 42: An das Cystein 167 gebundenes Tetraketid sowie freies CoA-SH

An diese letzte Verlängerungsreaktion schließt sich eine intramolekulare Claisen-Kondensation an. Dabei greift das C-6 des Tetraketids am C-1 der aliphatischen Kette an, die direkt an die Sulfid-Gruppe des Cysteins 167 gebunden ist. Dabei wird der Thioester gespalten und es entsteht nach Aromatisierung das 2,4,6-Trihydroxybenzophenon (Abb. 43).

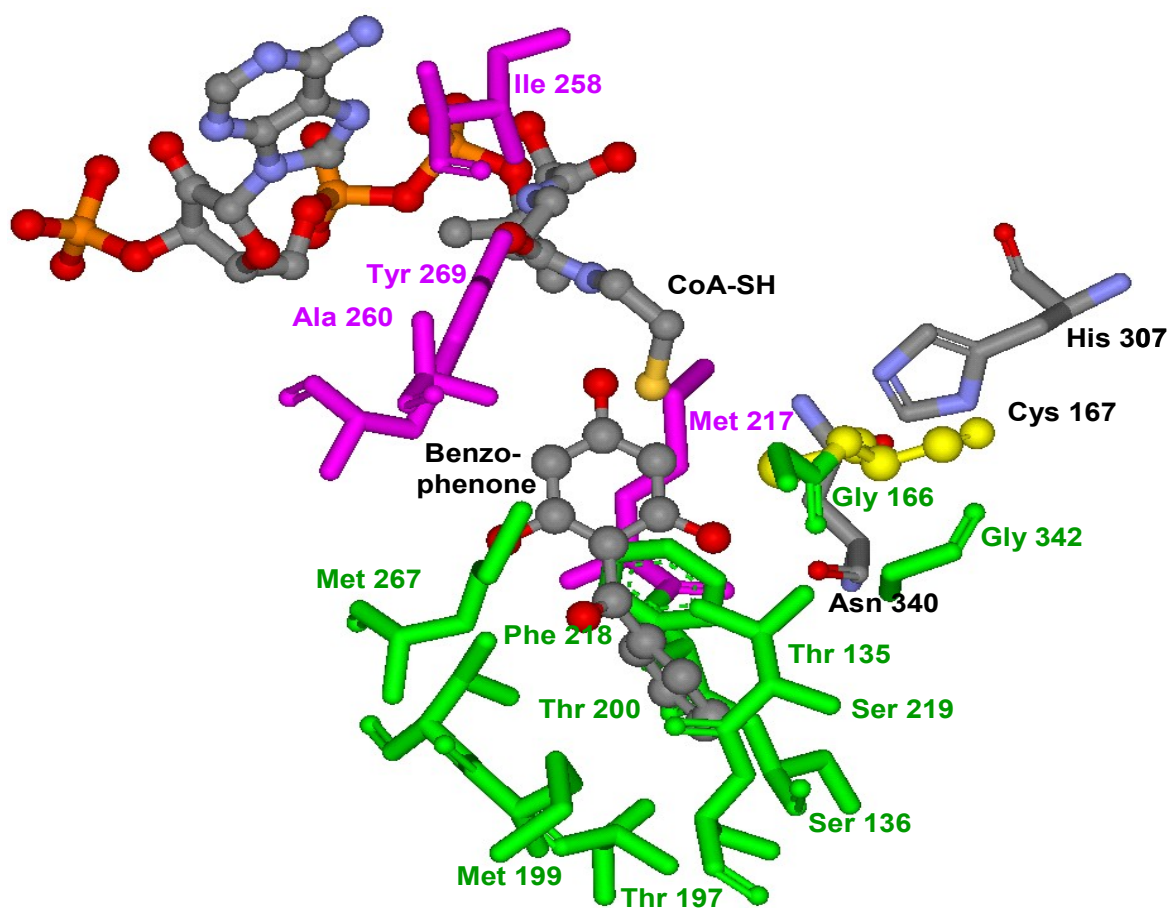


Abbildung 43: Aktives Zentrum der BPS mit eingelagertem 2,4,6-Trihydroxybenzophenon sowie freiem CoA-SH

## 4.7 Rationalisierung der T135L-Mutante durch Modellierung

### 4.7.1 Postulierter Reaktionsmechanismus der Mutante

Wird von dem Modell in 4.6 für den Reaktionsmechanismus der Wild-Typ-BPS ausgegangen, stellt sich die Frage, was die Ursache für eine massive Substrat- und Produktspezifitätsänderung ist, wenn in der Aminosäuresequenz der BPS an der Position 135 das Threonin gegen Leucin ausgetauscht wird. Aus den kinetischen Daten geht hervor, dass die katalytische Effizienz des Wild-Typs in Bezug auf das bevorzugte Substrat Benzoyl-CoA etwa der seiner Mutante T135L entspricht. Zum Kettenverlängerer Malonyl-CoA besitzt die Mutante eine höhere Affinität als der Wild-Typ (4.5.3). Die Temperatur- und pH-Optima ähneln sich (4.5.2). Beide Enzyme zeigen keine Aktivität zu anderen getesteten aromatischen Substraten bzw. zum aliphatischen Acetyl-CoA.

Der Reaktionsablauf ist wahrscheinlich bei beiden Enzymen bis zur zweiten Verlängerung von Benzoyl-CoA gleich. In der Mutante T135L bricht die Elongationsreaktion jedoch nach der Entstehung des Triketids ab und das Produkt 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on entsteht durch C5-O  $\rightarrow$  C1-Laktonisierung. Im BPS Wild-Typ schließt sich noch eine weitere C<sub>2</sub>-Elongation an. Nach der Entstehung des Tetraketids erfolgt eine C6  $\rightarrow$  C1-Claisen-Kondensation. Das heißt, dass zunächst eine Zyklisierung des Tetraketids und anschließend eine Aromatisierung zum 2,4,6-Trihydroxybenzophenon erfolgt (Abb. 44).

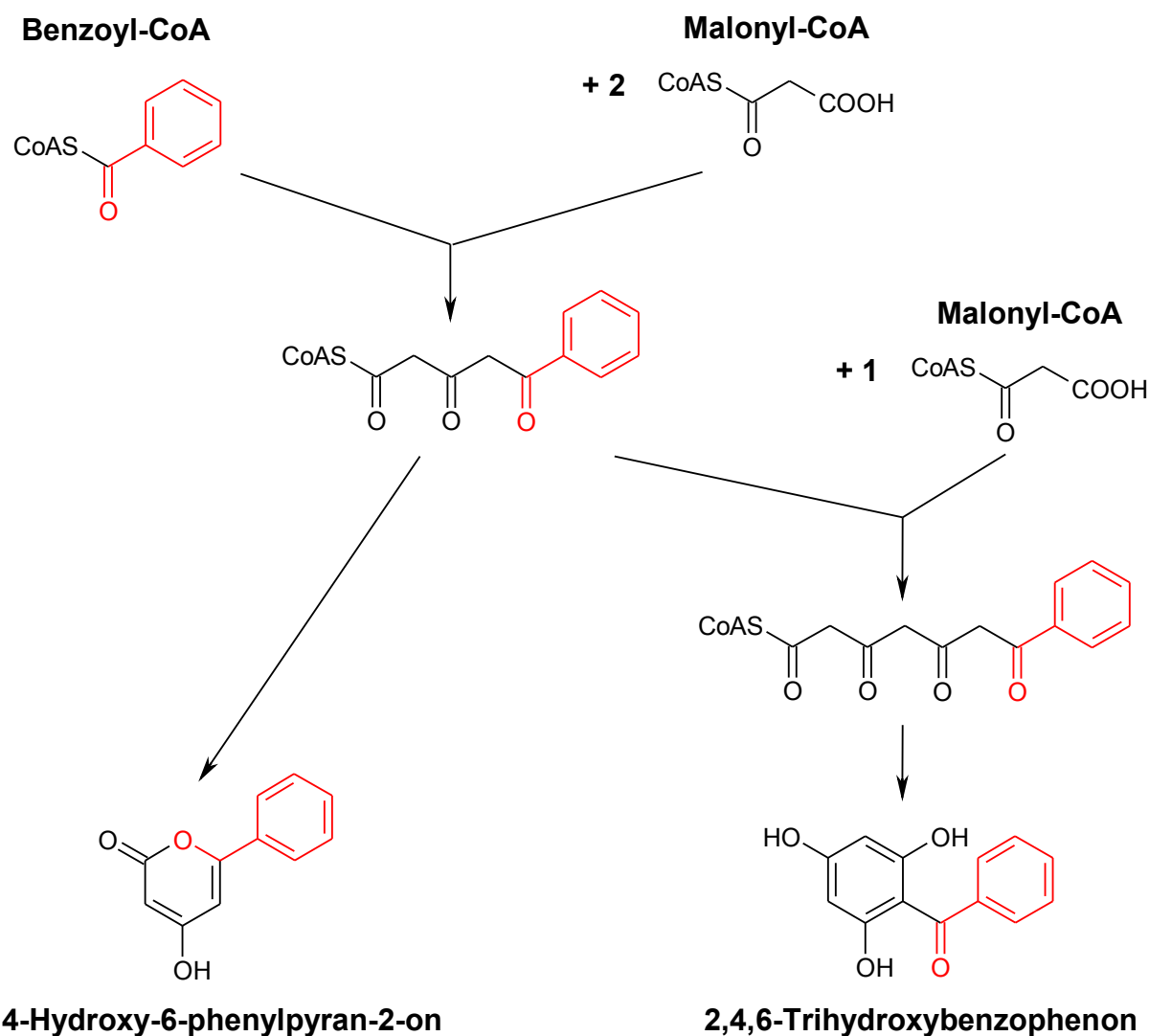


Abbildung 44: Postulierte Reaktion der BPS Mutante T135L (links) und des BPS-Wild-Typs (rechts)

#### 4.7.2 Modellierung von Mutante und Wild-Typ mit Benzoyl-CoA als Starter-Substrat

Um die Veränderung im Detail zu verstehen wurden alle Teilschritte der Reaktionen modelliert (1.4). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 45 - 48 dargestellt. Im Modell können vor der Entstehung des Triketids keine signifikanten Unterschiede zwischen Wild-Typ und Mutante T135L in der Moleküldynamik festgestellt werden. Interessanterweise existiert jedoch für das gebildete Triketid im Wild-Typ und in der BPS T135L-Mutante ein unterschiedlicher Bindungsmodus. Daraus ergeben sich folgende Unterschiede zwischen den Modellen für die Reaktionsmechanismen von Wild-Typ und Mutante. Die Differenzierung der Reaktionen erfolgt wahrscheinlich nach erfolgreicher zweiter Kettenverlängerung. Im Vergleich zum Wild-

Typ (Abb. 45 und 46) öffnet sich in der Mutante T135L eine neue Bindetasche. Die Phenylgruppe des gebildeten Triketids lagert sich neben der neu eingeführten Aminosäure Leu 135 in die neue Bindetasche ein, was im Folgenden detaillierter ausgeführt wird. Die Abbildungen 45 und 46 zeigen das aus zweifacher Verlängerung resultierende Benzoyl-Triketid im aktiven Zentrum des BPS-Wild-Typs. Das Threonin 135 ist über seine OH-Gruppe mit den polaren Gruppen der umliegenden Aminosäuren Glycin 166 und Glutamin 165 über Wasserstoffbrücken verbunden (grüne punktierte Linien) und dadurch fixiert. Folglich behindert es nicht den Elongationsweg für eine dritte Kettenverlängerung vom Triketid zum Tetraketid.

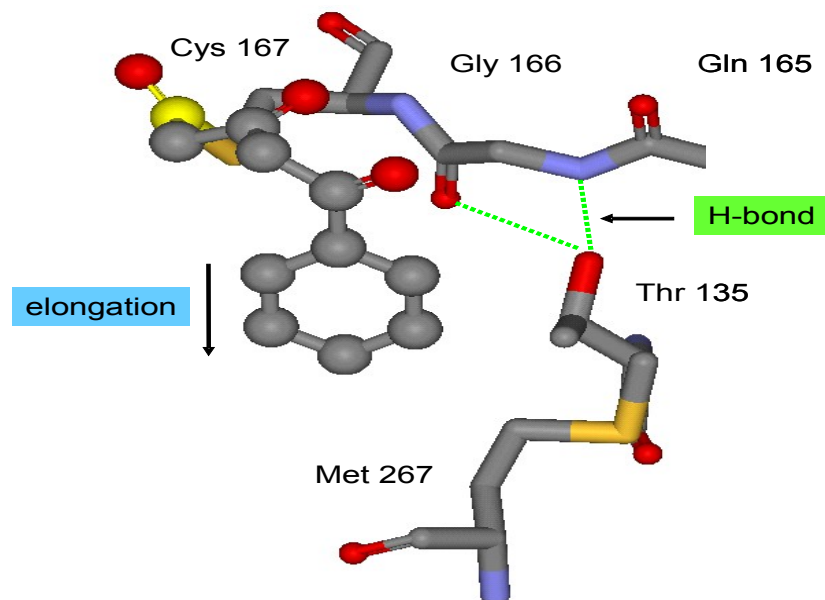


Abbildung 45: BPS-Wild-Typ mit Triketid-Zwischenprodukt (Aufsicht)

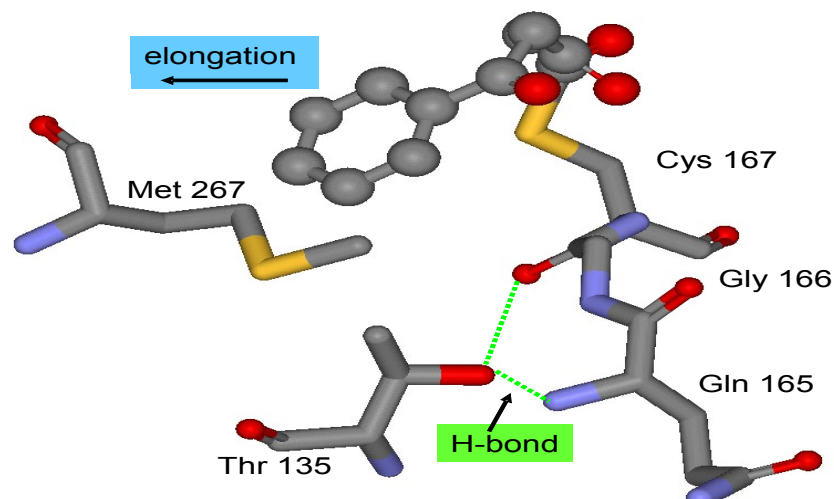


Abbildung 46: BPS-Wild-Typ mit Triketid-Zwischenprodukt (Seitenansicht)

Im Gegensatz dazu ist diese Geometrie der Bindungstasche bei der Mutante T135L gestört, da Leucin 135 keine OH-Gruppe besitzt. Eine Wasserstoffbrückenbindung mit den umliegenden Aminosäuren ist somit ausgeschlossen. Die mit dem Programm Moloc berechnete Lage der neuen Aminosäure Leucin 135 führt zur Öffnung einer neuen Bindetasche, in die sich der zweifach verlängerte Benzoyl-Rest als Triketid einlagern kann (Abb. 47 und 48). Dies wird durch Wechselwirkungen zwischen dem Phenylrest und der lipophilen Seitenkette des Leucins 135 unterstützt.

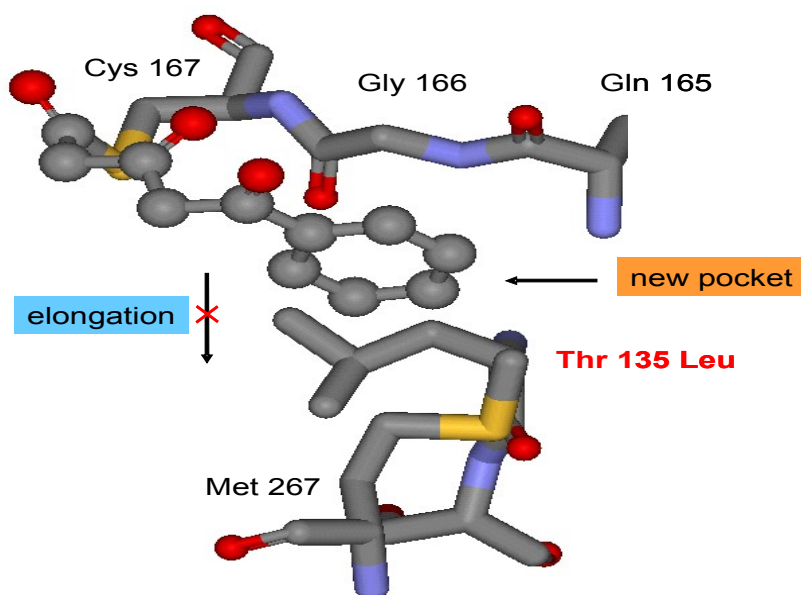


Abbildung 47: BPS-Mutante T135L mit Triketid (Aufsicht)

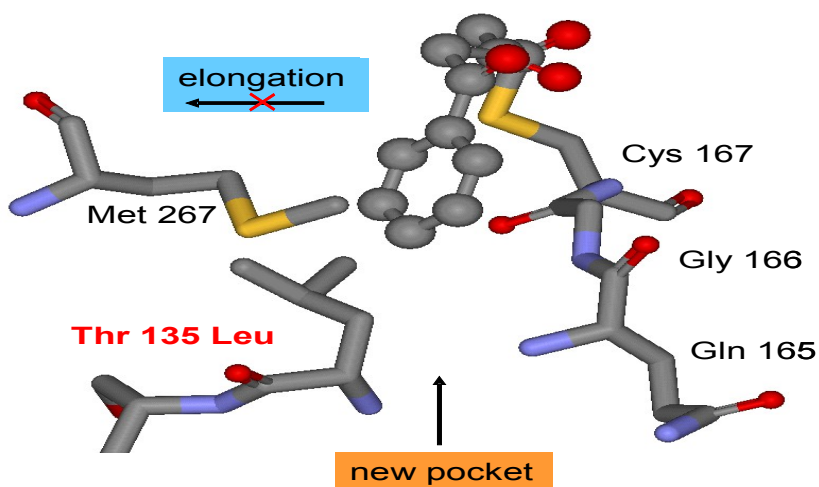


Abbildung 48: BPS-Mutante T135L mit Triketid (Seitenansicht)

Um vergleichen zu können, in wie weit die neue Tasche das Volumen des aktiven Zentrums beeinflusst, wird sie mit dem Computerprogramm CASTp vermessen. Das Volumen der Gesamttasche des Wild-Typs, einschließlich des CoA-Tunnels, wird mit  $1264 \text{ \AA}^3$  berechnet. Die neue Tasche vergrößert das Gesamtvolumen auf  $1337 \text{ \AA}^3$ . Die Größe der neuen Tasche wird, ausgehend von der veränderten Aminosäure, bestimmt. Sie ist  $4 \text{ \AA}$  hoch,  $7 \text{ \AA}$  weit und  $6 \text{ \AA}$  tief, hat also ein Volumen von  $168 \text{ \AA}^3$ . Dies entspricht in etwa der Größe eines Phenyl-Substituenten ( $144 \text{ \AA}^3$ ). Die Gesamtgröße der Bindetasche wird durch die Mutation nur um ca.  $73 \text{ \AA}^3$  vergrößert. Das deutet darauf hin, dass die neue Geometrie in der Umgebung der T135L-Mutation die ursprüngliche Bindetasche für die Elongation verkleinert. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass sich der Phenyl-Rest bevorzugt in die neue lipophile Bindetasche einlagert. Die Größe dieser Bindetasche begrenzt die Kettenverlängerung offensichtlich auf zwei Schritte.



### 4.7.3 Modellierung von Mutante und Wild-Typ mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA als Starter

Die Untersuchungen mit dem Substrat 3-Hydroxybenzoyl-CoA zeigen, dass die Mutante im Gegensatz zum Wild-Typ nur geringe Aktivität mit diesem Substrat aufweist. In den Abbildungen 49 und 50 ist das Triketid des 3-Hydroxybenzoyl-Starters in das aktive Zentrum der Wild-Typ-BPS modelliert worden. Die Seitengruppe von Threonin 135 ist mit ihrer OH-Gruppe durch Wasserstoffbrücken (grüne punktierte Linien) an die hydrophilen Gruppen der umliegenden Aminosäuren Glycin 166 und Glutamin 165 gebunden. Eine weitere dritte Elongation ist möglich, da der Hydroxybenzoylrest über das Methionin 267 hinweg verlängert werden kann.

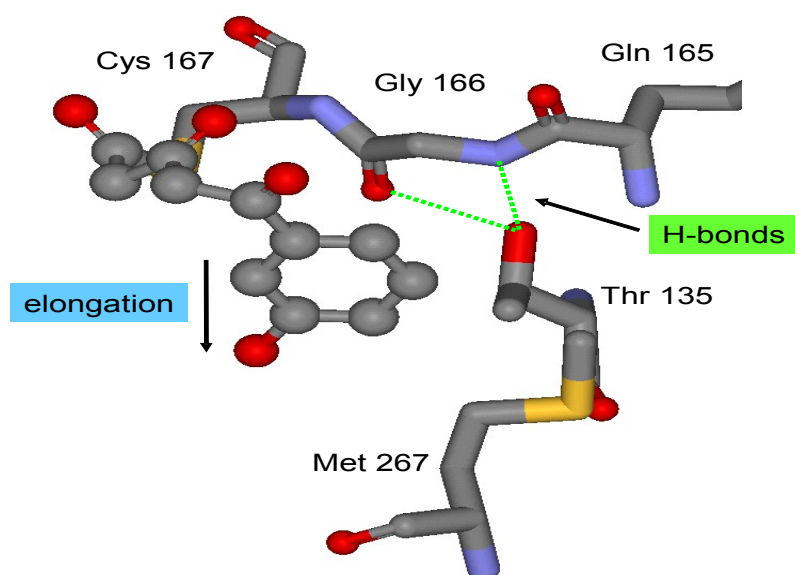


Abbildung 49: Wild-Typ-BPS mit 3-Hydroxybenzoyl-Triketid (Aufsicht)

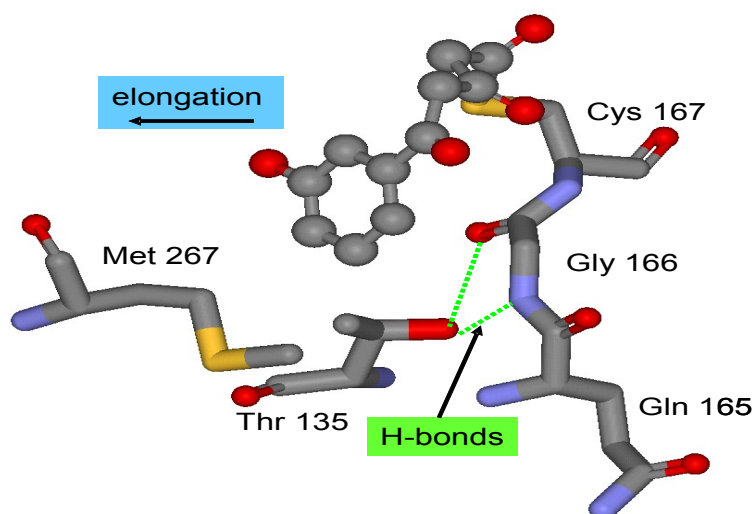


Abbildung 50: Wild-Typ-BPS mit 3-Hydroxybenzoyl-Triketid (Seitenansicht)

In der Mutante T135L ist Leucin 135 nicht über Wasserstoffbrückenbindungen fixiert und sein Seitenrest schiebt sich in den freien Raum, der normalerweise von der Polyketidkette bei ihrer Verlängerung eingenommen würde. Nach der zweiten Elongation lagert sich der 3-Hydroxyphenylrest in die neu gebildete kleine Tasche ein (Abb. 51 und 52). Prinzipiell sollte dann eine Freisetzung des Produkts aus dem aktiven Zentrum möglich sein. Experimentell läßt sich dies aber nur in geringem Ausmaß nachweisen. Im Modell kann dieser Unterschied zu den Beobachtungen mit dem vorher beschriebenen Substrat Benzoyl-CoA folgendermaßen interpretiert werden: Im Strukturmodell kommt die OH-Gruppe des 3-Hydroxybenzoylrests genau in der Position zu liegen, in der sich beim Wild-Typ die OH-Gruppe des Threonins 135 befand. Die hydrophile Gruppe bildet so starke Wasserstoffbrückenbindungen (grüne punktierte Linien) mit den umliegenden Aminosäuren Glycin 166 und Glutamin 165 aus, dass das Triketid in der aktiven Tasche fixiert ist und praktisch als Suizid-Inhibitor wirkt. Das Enzym ist nur noch in geringem Maße zu weiteren Reaktionen fähig.

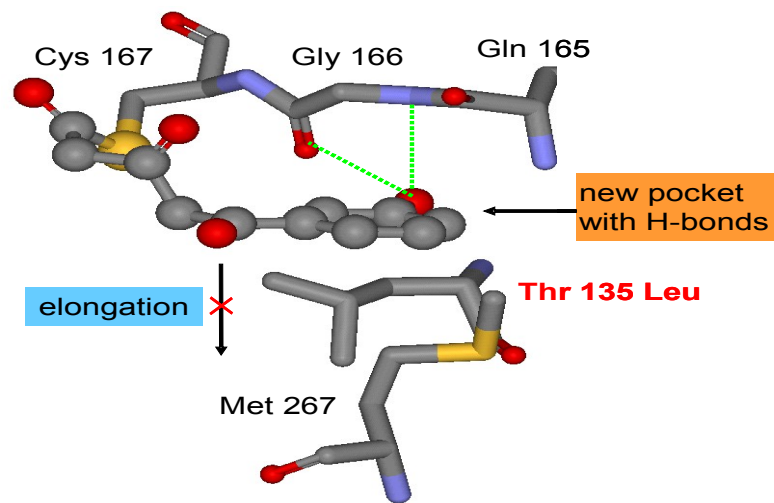


Abbildung 51: BPS-Mutante T135L mit 3-Hydroxybenzoyl-Triketid (Aufsicht)

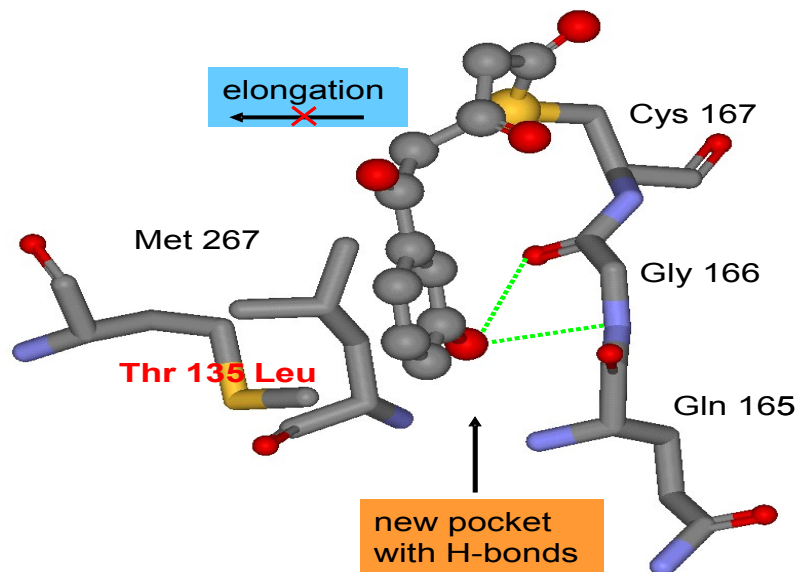


Abbildung 52: BPS-Mutante T135L mit 3-Hydroxybenzoyl-Triketid (Seitenansicht)

## 5. Diskussion

Der für Polyketidsynthasen Typ III typische Reaktionsverlauf ist erstmals von Birch und Donovan (1953) erkannt worden. Die erste PKS Typ III wurde 1975 aus *Petroselinum hortense* isoliert und charakterisiert (Kreuzaler und Hahlbrock, 1975). Es handelt sich um eine Chalkonsynthase (CHS), die heute als Prototyp-Enzym der PKS Typ III gilt. Es folgte 1985 die Klonierung von zwei CHS-Isoenzymen, deren Gene beide aus *Pentunia hybrida* gewonnen wurden (Reif et al., 1985). Zum ersten Mal konnten damit Untersuchungen über Produkt- und Substratspezifitäten in Bezug auf PKS Typ III erfolgen. Seitdem sind weit über hundert PKS Typ III isoliert, kloniert und charakterisiert worden, wobei es sich in erster Linie um Chalkonsynthasen handelt. Zudem aber wurde im Laufe der Zeit eine geringe Zahl von CHS-ähnlichen Enzymen nachgewiesen, die sich deutlich in ihrer Substrat- und Produktspezifität unterscheiden (Austin und Noel, 2003). Zu ihnen gehört die BPS. Ferrer et al. (1999) gelang die erste Röntgenanalyse der Kristallstruktur einer CHS aus Luzerne. Damit war die exakte Untersuchung des Mechanismus einer PKS Typ III möglich. Bis heute sind weitere Kristallstrukturen dieser CHS mit verschiedenen Mutationen und Liganden veröffentlicht worden (Austin et al., 2004). Wie demnach die Reaktionsschritte aussehen, ist in Abb. 36 gezeigt.

Auf Grund der Klonierung von PKS Typ III aus Angiospermen, Gymnospermen, Moosen, Farnen und Bakterien kann durch einen Aminosäuresequenzvergleich ein Stammbaum (Abb. 53) erstellt werden, der eine Aussage über die evolutionäre Entstehung dieser PKS Typ III macht (Liu et al., 2007). Dabei geht man davon aus, dass der Ursprung aller pflanzlichen PKS Typ III in der CHS liegt. Zum einen ist sie ubiquitär in Pflanzen enthalten (Austin und Noel, 2003) und zum anderen besitzt jede bisher bekannte pflanzliche PKS Typ III eine Aminosäuresequenzidentität zur CHS von mindestens 40 % (Ferrer et al., 1999). Wahrscheinlich sind CHS-verwandte PKS Typ III durch Genduplikation entstanden, wobei eines der Gene die CHS-Aktivität konservierte, während das andere die Substrat- bzw. Produktspezifität im Laufe der Evolution je nach Taxon änderte (Liu et al., 2007). Dies ist auf Mutationen der Aminosäuren im aktiven Zentrum und darüber hinaus der jeweiligen PKS Typ III zurückzuführen (Tropf et al., 1994).

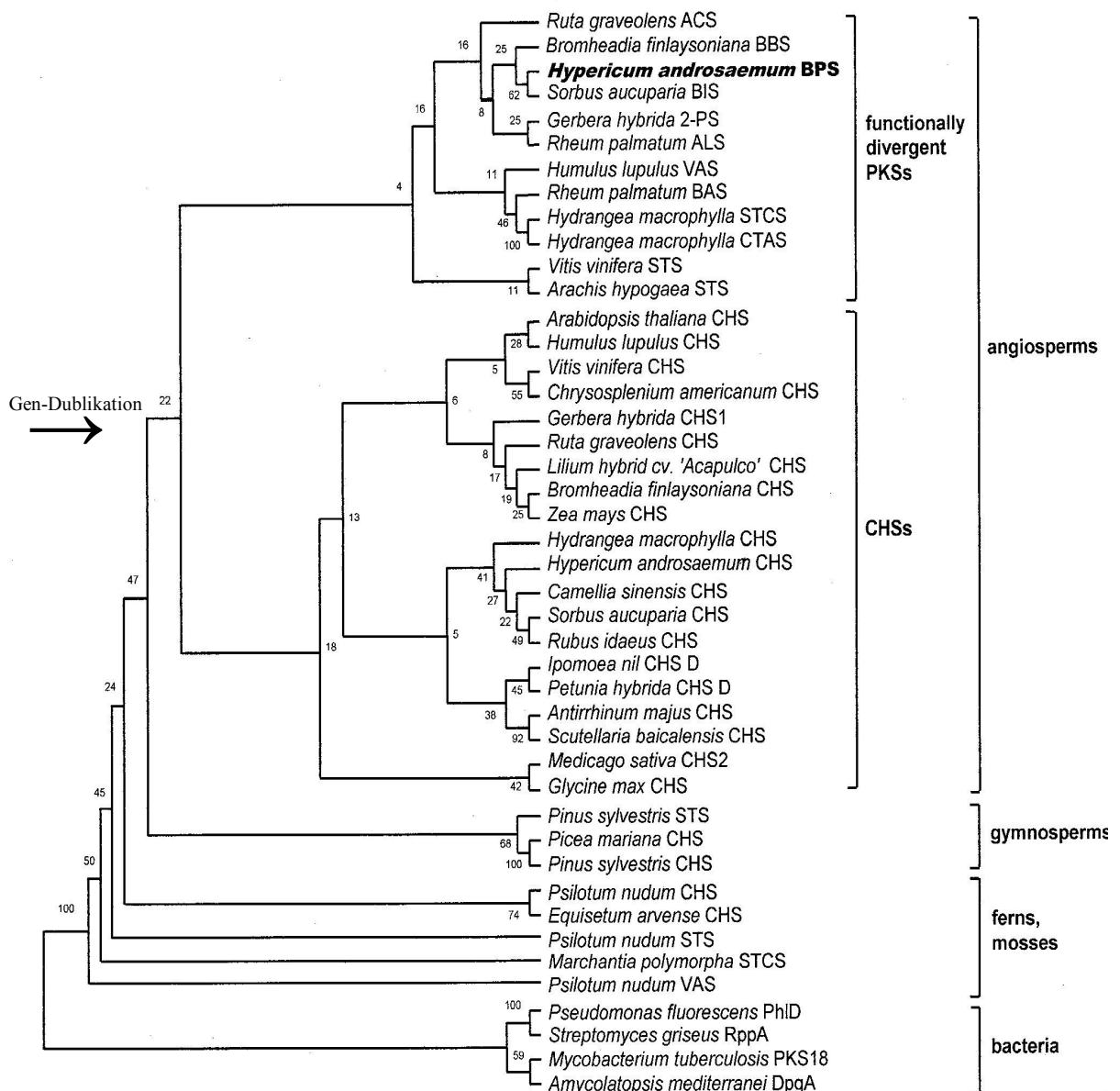


Abbildung 53: Stammbaum der CHS und CHS-verwandten PKS Typ III. Die Zahlen an den Gabeln sagen aus, wie oft bei 100 facher Verwandtschaftsanalyse das Computerprogramm (CLUSTALX; Version 1.81) diese Zuordnung der PKS Typ III vornimmt. Vier funktionell untersuchte bakterielle PKS Typ III wurden in den Stammbaum eingearbeitet. STS: Stilbensynthase, VAS: Valerophenonsynthase, BAS: Benzalacetonsynthase, CTAS: 4-Cumaroyltriacetatlaktonsynthase, STCS: Stilbencarboxylatsynthase, ACS: Acridonsynthase, CHS: Chalconsynthase, 2-PS: 2-Pyransynthase, ALS: Aleosonsynthase, BBS: Bibenzylsynthase, BIS: Biphenylsynthase, BPS: Benzophenonsynthase, DpgA: 3,5-Dihydroxyphenylacetatsynthase, RppA: 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalensynthase, PhID: Acetylphloroglucinolsynthase.

Wie in der Einleitung aufgeführt, ist die CHS verantwortlich für die Entstehung des Grundgerüsts der Flavonoide. Dabei wird ein *p*-Cumaroyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem Tetraketid verknüpft, um dieses anschließend durch eine Claisen-Kondensation zum Naringenin-Chalkon zu zyklisieren und zu aromatisieren (Ferrer et al., 1999). Die CHS kommt ubiquitär in Pflanzen vor, ist allerdings nicht das einzige Enzym, das *p*-Cumaroyl-CoA als Startersubstrat akzeptiert. Es gibt Pflanzenfamilien, in denen dieses Substrat ebenfalls durch eine PKS Typ III verarbeitet wird. Dazu gehören beispielsweise die STS aus den Familien der Pinaceen oder der Fabaceen (Tropf et al., 1994) oder die BAS aus den Familien der Polygonaceen und Rosaceen (Abe et al., 2007). STS besitzt eine Aminosäuresequenzidentität zu CHS von 75 – 90% (Austin et al., 2004). Sowohl STS als auch CHS besitzen in sehr geringem Maße CHS- bzw. STS- Aktivität (Yamaguchi et al., 1999; Suh et al., 2000). Das bedeutet, dass sowohl die CHS Stilben als auch die STS Naringenin-Chalkon als Nebenprodukt herstellt. Die beiden Produkte differenzieren sich in ihrer Entstehung letztendlich durch die Faltung des intermediären Tetraketids (Austin et al., 2004). Unterschiede sind also nur im letzten Reaktionsabschnitt zu finden. Bei der CHS schließt sich nach der Entstehung des Tetraketids eine Claisen-Kondensation an, dabei entsteht ein C6 → C1-Ringschluss. Bei der STS kommt es nach der Tetraketidentstehung zu einer C2 → C7-Aldol-Kondensation (Tropf et al., 1995). Vergleiche der Kristallstrukturen von CHS aus Luzerne und STS aus Kiefer führten zur Erzeugung eines vielfach mutierten Enzyms, in dem 18 Aminosäuren ausgetauscht wurden, um die CHS in eine STS umzuwandeln (Austin et al., 2004). Hierbei zeigte sich, dass letzten Endes die Position der Aminosäure T132 (Zählweise der CHS von Luzerne) im aktiven Zentrum der STS geringfügig verschoben ist (Abb. 54). In der STS vermittelt ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk eine kryptische Thioesterase-Aktivität („Aldol-Schalter“), die zur Hydrolyse der kovalenten Bindung zwischen Tetraketid-Intermediat und katalytischem Cystein durch ein aktiviertes nukleophiles Wassermolekül führt. Die resultierende freie Carbonsäure zyklisiert bevorzugt durch Aldol-Kondensation. Das Wassermolekül ist durch Serin 338 sowie Glutamin 192 über die Hydroxylgruppe von Threonin 132 stabilisiert (Abb. 54, rechtes Teilbild).

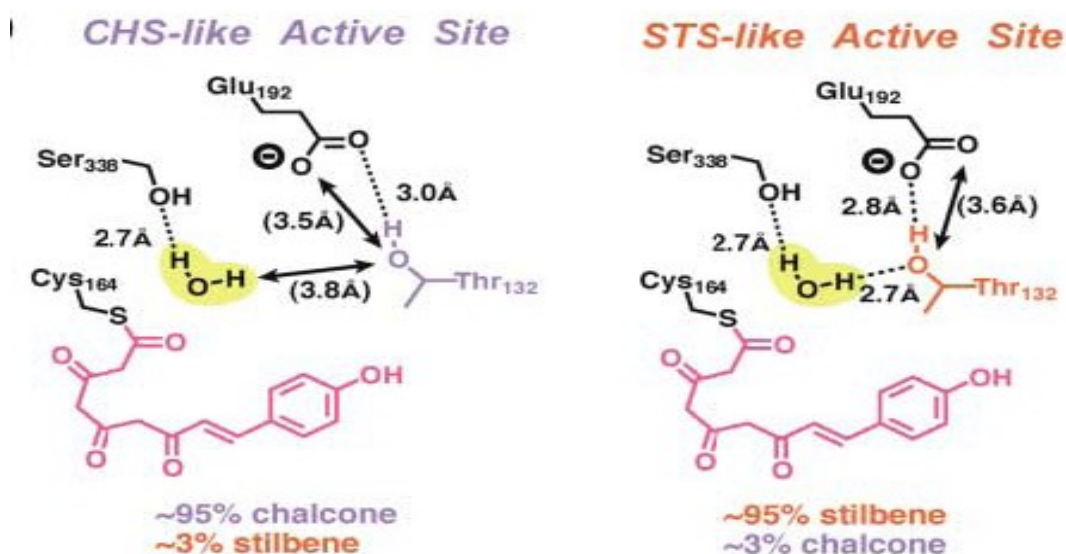


Abbildung 54: Aktive Zentren der CHS (links) und der STS (rechts) mit dem eingelagerten Tetraketid und einem Wasser-Molekül (gelb) (Austin et al., 2004)

Dies steht jedoch im Widerspruch zur BIS aus *S. aucuparia*, bei der sich ebenfalls eine Aldol-Kondensation nach Entstehung eines Tetraketids anschließt. Hier sind Serin 338 durch Glycin und Threonin 132 durch Alanin ersetzt, was auf einen anderen Reaktionsmechanismus schließen lässt (Liu et al., 2007). Dieser wird zur Zeit durch Röntgenstrukturanalyse der BIS geklärt (Raeth, 2007).

Aus dem Stammbaum (Abb. 53; Liu et al., 2007) kann man entnehmen, dass von den PKS Typ III, die Benzoyl-CoA *in vivo* umsetzen, bisher nur BPS sowie BIS bekannt sind. Sie unterscheiden sich ähnlich wie CHS und STS im letzten Reaktionsschritt. BIS und BPS haben eine 54 %ige Aminosäuresequenzidentität (Liu et al., 2007) und besitzen eine ähnliche Substratspezifität. Aus diesem Grund wurde ein Aminosäuresequenzvergleich der Enzyme durchgeführt. Alanin 260 und Tyrosin 269 (Zählweise der BPS) sind nur in diesen beiden Vertretern der pflanzlichen PKS gleich, ansonsten sind immer andere Aminosäuren an diesen Positionen zu finden. Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass Veränderungen an Position 269 keinen Einfluss auf die Substrat- und Produktspezifität haben. Lediglich bei Mutationen, bei denen größere Aminosäuren an Position 260 eingeführt werden, geht die Aktivität der BPS verloren. Weitere Unterschiede liegen in Position 217, die mit Methionin (4.3.1) in BPS und Leucin in BIS besetzt ist, und in Position 258, an der Valin bei BPS anstelle von Isoleucin bei BIS zu finden ist. Der Austausch von Valin gegen Isoleucin besitzt allerdings keinerlei Einfluß auf die Aktivität der BPS. Durch Veränderungen an der Elongati-

onstasche kann gezeigt werden, dass das Enzym an zwei Positionen schnell inaktiviert wird: Threonin 135, das zu Alanin, und Threonin 200, das zu Phenylalanin mutiert wurde. Der Austausch von Methionin 267 zu Phenylalanin ändert nichts an den Spezifitäten der BPS. Auch die Veränderung von Methionin 267 zu Leucin beeinflusst die Aktivität der BPS nicht. Es scheint ohne Bedeutung zu sein, welche unpolare Aminosäure (Methionin, Leucin oder Phenylalanin) sich an dieser Stelle der Elongationstasche befindet.

Die BAS besitzt eine Aminosäuresequenzidentität zur CHS aus Luzerne von ca. 75 %. BAS akzeptiert ebenso wie CHS als Startersubstrat *p*-Cumaroyl-CoA. Im Gegensatz zu CHS wird dieses aber nur einmal mit Malonyl-CoA zu einem Diketid verknüpft, aus dem Benzalaceton unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> entsteht. Bei dem Vergleich der beiden Sequenzen fällt auf, dass in der BAS eine Aminosäure, die sonst in allen pflanzlichen PKS Typ III an dieser Position vorkommt, verändert ist. BAS besitzt an Position 215 (Zählweise der CHS aus Luzerne) ein Leucin, sämtliche anderen PKS Typ III haben an Position 215 aber ein Phenylalanin. Die Position liegt genau zwischen dem CoA-Bindetunnel und der Initiations-/Elongationstasche. Da sie für die Decarboxylierungsreaktion sowie die Substratorientierung verantwortlich ist, wird sie als sogenannter „gate keeper“ bezeichnet (Abe et al., 2003). Durch punktuelle Mutationen werden an den Positionen 214 und 215 die Aminosäuren Isoleucin und Leucin zu Leucin bzw. Phenylalanin umgewandelt. Dies führt dazu, dass bei der CHS-Doppelmutante nunmehr Naringenin-Chalkon zum Nebenprodukt wird und Bishnoryangonin (BNY; entstanden aus dem intermediären Triketid) als Hauptprodukt entsteht (Abe et al., 2003). Die umgekehrte Vorgehensweise, also eine Mutation der BAS in Richtung CHS führt dazu, dass keinerlei BAS-Aktivität messbar ist. Stattdessen wird BNY als Hauptprodukt detektiert (Abb. 55).

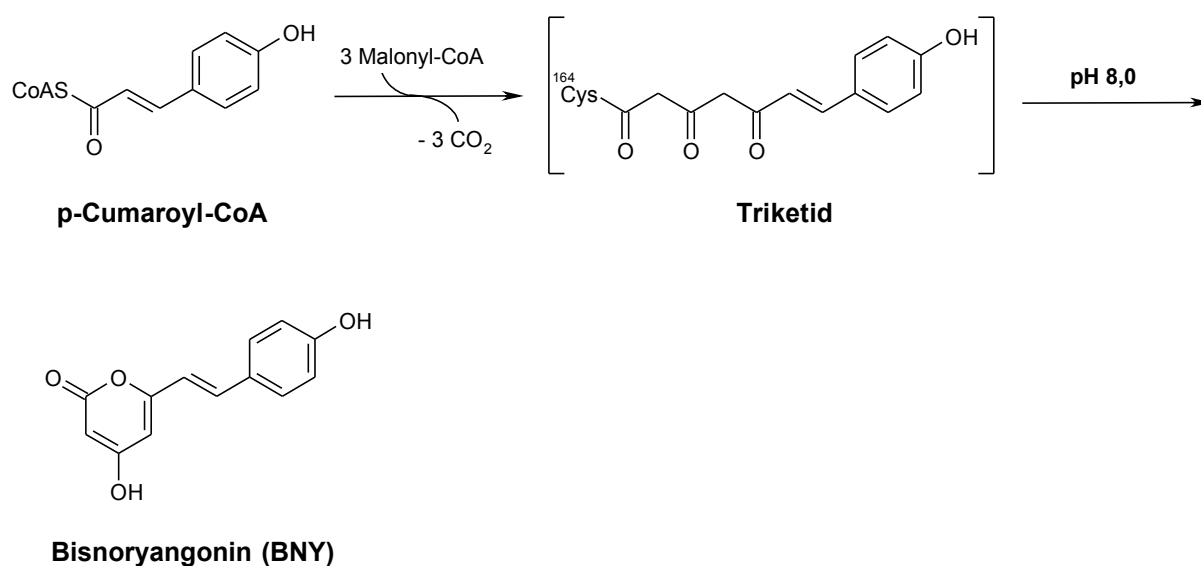


Abbildung 55: Reaktion der CHS-Mutante LF214/215IL bei Inkubation mit Malonyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA



Laut Ferrer et al. (1999) besitzen PKS Typ III noch eine weitere Aminosäure, die als „gate keeper“ agiert (Abb. 56).

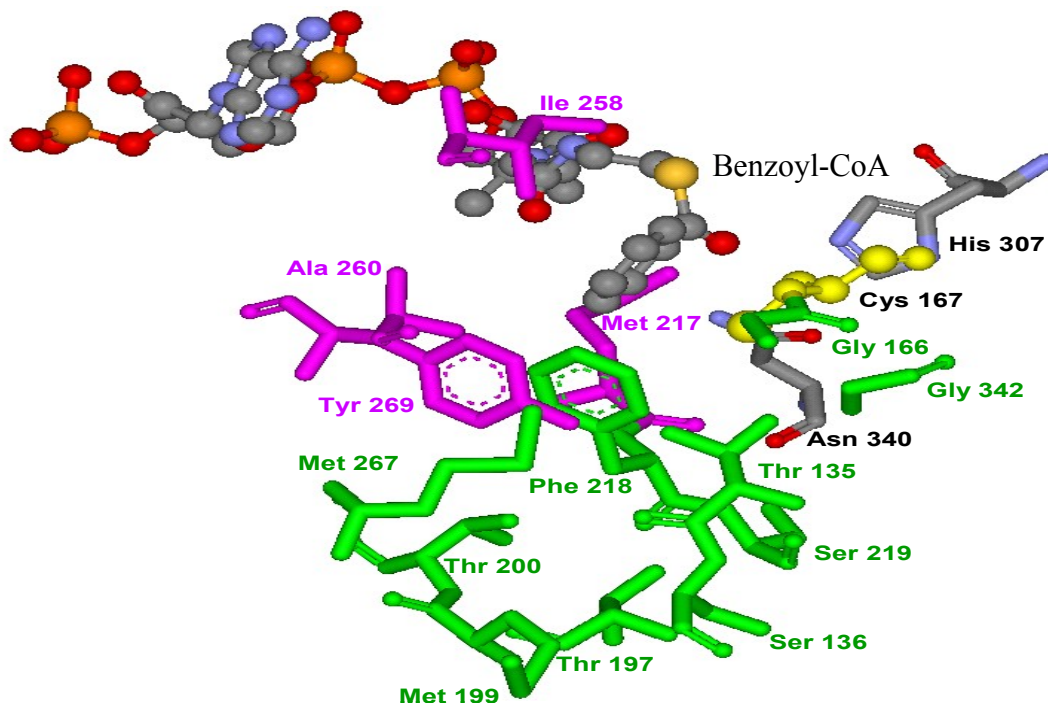


Abbildung 56: Aktives Zentrum der BPS mit eingelagertem Benzoyl-CoA

Es handelt sich um die Position 265 (Zählweise der CHS aus Luzerne) bzw. 269 (Zählweise der BPS aus Johanniskraut), in der sich in der BPS ein Tyrosin befindet. Der andere „gate keeper“, Phenylalanin 218 (Zählweise nach BPS), ist in Richtung BAS von *R. palmatum* zu einem Leucin mutiert worden. Mit dieser Mutation kann mit sämtlichen Substraten keine Aktivität nachgewiesen werden. Auch *p*-Cumaroyl-CoA, mit dem die BAS *p*-Hydroxybenzalaceton bildet, wird von der Mutante analog zum BPS Wild-Typ nicht akzeptiert. Damit stellt das Phenylalanin eine entscheidende Aminosäure an dieser Position dar. Bei Tyrosin 269 gibt es Unterschiede. Wird diese Aminosäure zu Phenylalanin mutiert, ist keinerlei Veränderung von Substrat- oder Produktspezifität im Vergleich zum BPS Wild-Typ zu beobachten. Trotz der hydrophilen Gruppe im Tyrosin stellt diese Aminosäure nicht zwangsläufig eine ausschlaggebende Position für die Substratspezifität dar.

Aus der Publikation von Liu et al. (2003) geht hervor, dass es möglich ist, eine CHS aus *H. androsaemum* in eine BPS umzuwandeln. Beide Enzyme besitzen eine ca. 60 %ige Aminosäuresequenzidentität. CHS besitzt bereits 22,3 % relative Aktivität mit Benzoyl-CoA.

Durch Dreifachmutation (L263M / F265Y / S338G, Zählweise CHS aus Johanniskraut) ist das Verhältnis der Umsetzung von *p*-Cumaroyl-CoA zu Benzoyl-CoA von 4,5 : 1 beim Wild-Typ auf 1 : 1,9 bei der Tripelmutante umkehrbar. Die Lage der drei mutierten Reste im aktiven Zentrum ist in Abb. 57 gezeigt.

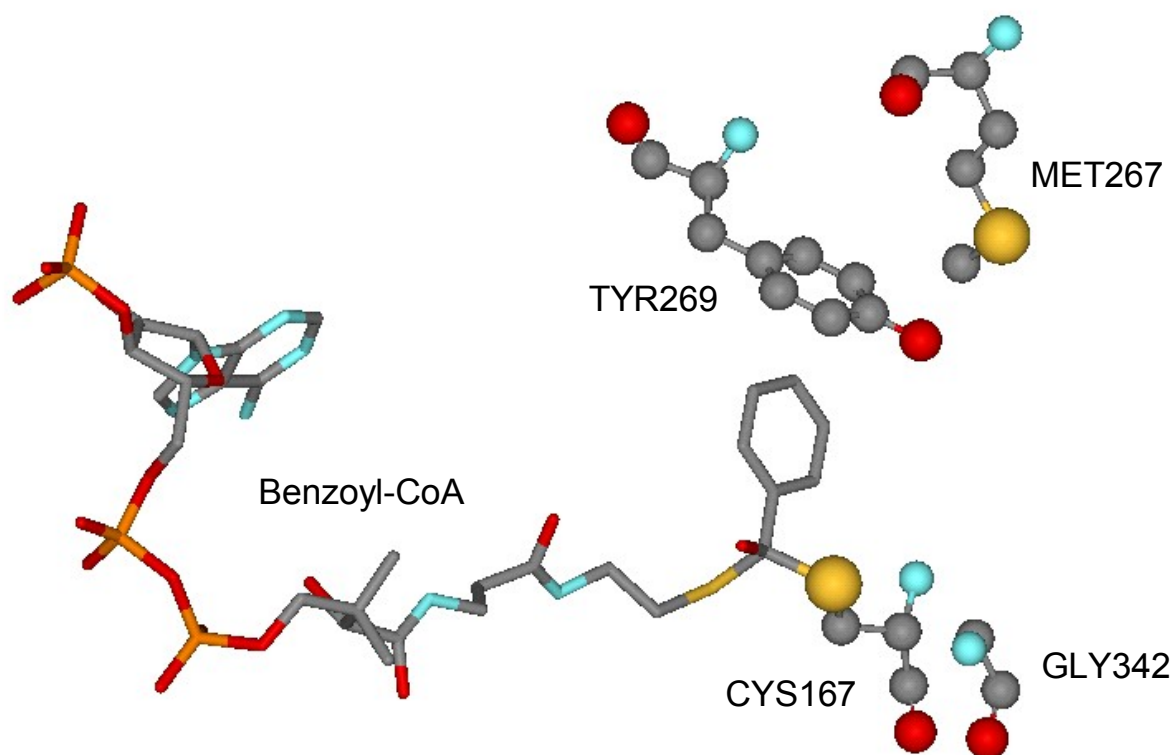


Abbildung 57: Homologiemodell des aktiven Zentrums der BPS. Die Benzoyl-CoA-Startereinheit ist an das katalytische Cysteine 167 gebunden. Außerdem sind die Positionen der drei mutierten Aminosäuren (Liu et al., 2003) dargestellt.

Eine Spezifitätsveränderung durch Mutation der BPS aus *H. androsaemum* in Richtung CHS gelingt nicht. Weder Einzelmutationen noch Kombinationen aus diesen zeigen eine Aktivität mit *p*-Cumaroyl-CoA. Selbiges Ergebnis ist bereits bei Mutationen von BAS zu CHS gefunden worden (Abe et al., 2003). Auch dort lässt sich eine BAS in eine CHS umwandeln. Die Umkehrung von CHS in BAS jedoch schlägt fehl.

Lukačín et al. (2001) gelingt zum ersten Mal die Umwandlung einer ACS aus *Ruta graveolens* in eine CHS. ACS und CHS haben eine Aminosäuresequenzidentität von ca. 75 %, wobei ACS bereits eine relative CHS-Aktivität von 20 % besitzt. Interessanterweise ändert sich die Spezifität der ACS durch eine einfache Mutation in Position 265 (Zählweise CHS aus

Luzerne) in der Art, dass die Mutante 75 % mehr CHS-Aktivität und 75 % weniger ACS-Aktivität aufweist. Bei dieser Mutation wird Valin gegen Phenylalanin ausgetauscht. Zwei zusätzliche Mutationen in der ACS-Aminosäuresequenz sind nötig, um ACS gänzlich in CHS umzuwandeln: Serin 132 und Alanin 133.

Ein Vergleich der ACS-Aminosäuresequenz mit der BPS-Aminosäuresequenz zeigt, dass sich die ACS im aktiven Zentrum in sechs Positionen von der BPS unterscheidet. Die ACS ist insofern interessant, da sie die einzige PKS Typ III ist, die als Hauptsubstrat ein in *ortho*-Position substituiertes Substrat, nämlich N-Methylantraniloyl-CoA, akzeptiert. Aus den bisher aus Clusiaceen isolierten Produkten geht hervor, dass das 2,4,6-Trihydroxybenzophenon als Produkt der BPS in der Pflanze häufig noch in 2'-Position hydroxyliert und zu einem Xanthon zyklisiert wird (Abb. 58; Fuller et al., 1999; Cuesta Rubio et al., 1999).

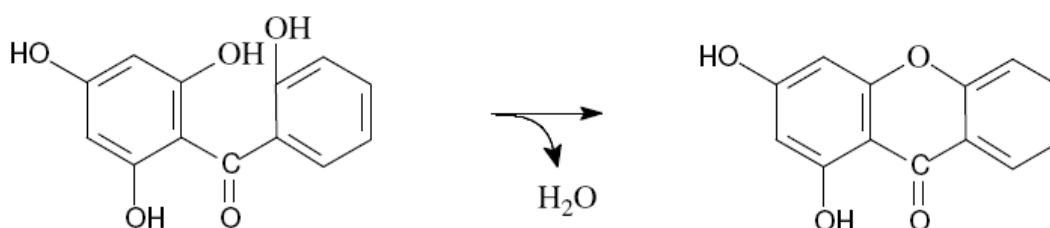


Abbildung 58: Zyklisierung eines *o,o*-dihydroxylierten Benzophenons zum entsprechenden Xanthon durch spontane Wasserabspaltung

Eventuell könnte man durch die Mutation der BPS diesen Schritt vorweg nehmen, indem ein bereits in *ortho*-Position hydroxyliertes Substrat akzeptiert wird. Der BPS Wild-Typ zeigt keinerlei Aktivität mit 2-Hydroxybenzoyl-CoA. Eine veränderte Spezifität könnte dazu führen, dass an Stelle des 2,4,6-Trihydroxybenzophenons ein 2,2',4,6-Tetrahydroxybenzophenon entsteht, welches anschließend unter spontaner Wasserabspaltung zum 1,3-Dihydroxyxanthon zyklisiert (Kitanov und Nedialkov, 2001). Deshalb werden zunächst wieder Einzelmutationen der BPS durchgeführt und die enzymatischen Aktivitäten vermessen. Sie zeigen keinerlei Produkt- und Substratspezifitätsänderungen im Vergleich zur Acridonsynthase. Einen starken Einfluß auf die Aktivität der BPS besitzt das Serin in Position 136. Wird dieses zu Alanin mutiert, zeigt das Enzym keinerlei Aktivität mehr mit den Substraten. Alle Mutationskombinationen mit dieser Mutante sind ebenfalls inaktiv. Das Enzym verliert seine Aktivität bei den getesteten Substraten, sobald in der Position 136 eine Polaritätsänderung von

hydrophil zu lipophil erfolgt. Die Mutanten sind zusätzlich zu den standardmäßig verwendeten Substraten (4.1) auch mit N-Methylantraniloyl-CoA getestet worden.

Die CHS wird von Jez et al. (2000) in 2-PS umgewandelt. Vergleichende röntgenspektrometrische Untersuchungen an CHS aus *Medicago sativa* und der 2-PS aus *Gerbera hybrida* ergeben, dass beide Enzyme in ihrer Raumstruktur ähnlich aufgebaut sind. Sie besitzen 74 % Aminosäurenidentität. Die Volumina der beiden aktiven Zentren jedoch unterscheiden sich mit 1019 Å<sup>3</sup> (CHS) zu 274 Å<sup>3</sup> (2-PS) deutlich (Abb. 59).

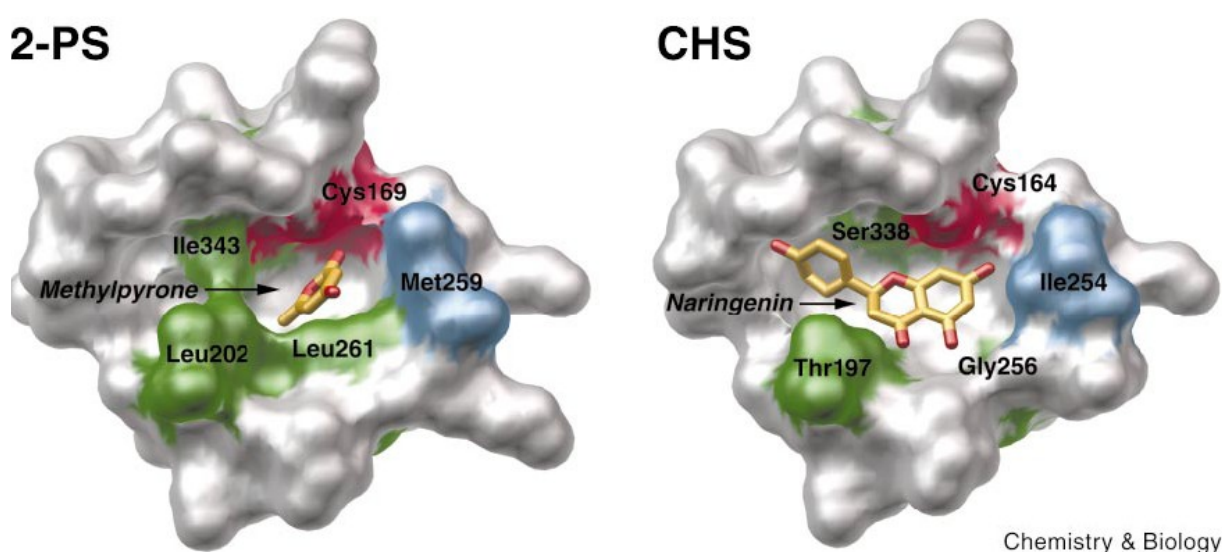


Abbildung 59: Vergleich der Größen der aktiven Zentren von 2-PS und CHS

Auf Grund dieser räumlichen Unterschiede lässt sich begründen, wieso derart unterschiedliche Substrate akzeptiert werden. Wie bereits erwähnt, hat CHS die größte Aktivität mit *p*-Cumaroyl-CoA, während 2-PS das wesentlich kleinere Acetyl-CoA als Startersubstrat bevorzugt. Gemeinsam ist den Enzymen die Aktivität mit Benzoyl-CoA, wobei die Produktspezifität allerdings eine andere ist. CHS bildet nach Entstehung der Tetraketidstufe ein Benzophenon wie die BPS (Abb. 2; Liu et al., 2003). 2-PS hingegen verknüpft Benzoyl-CoA mit nur zwei Malonyl-CoA zu einem Triketid, woraus anschließend ein Lakton entsteht (Abb. 4; Eckermann et al., 1998). Durch eine Dreifachmutation in der CHS gelingt es Jez et al. (2000), das aktive Zentrum dieses Enzyms so zu verkleinern, dass es kein *p*-Cumaroyl-CoA mehr akzeptiert, sondern eine identische Substrat- und Produktspezifität besitzt wie die 2-PS. Die Einzelmutationen in der CHS erbringen bereits höhere Aktivitäten mit Acetyl-CoA. Die Übertragung dieser Strategie führt in der vorliegenden Arbeit zu drei Einzelmutationen der BPS: T200L,

A260L und G342I. Alle drei Mutanten zeigen jedoch nicht die gewünschten Veränderungen, da keinerlei Aktivität mit Acetyl-CoA gemessen werden kann. Da eine der Mutanten, A260L, auch keine Aktivität mehr mit Benzoyl-CoA besitzt, werden keine Mehrfachmutationen mehr hergestellt.

Die Position 135 (Zählweise der BPS aus Johanniskraut) ist bei PKS Typ III besonders hervor zu heben. In der BPS befindet sich an dieser Position ein Threonin. Eine Veränderung zum hydrophilen Serin hat keinen Einfluss auf die Aktivität. Diese verschwindet aber, sobald ein Alanin als kleine, lipophile Aminosäure eingebaut wird. Größere lipophile Aminosäuren wie Phenylalanin verursachen wiederum keine Aktivitätsänderung. Ein Aktivitätsverlust tritt ebenfalls auf, nachdem Threonin 135 zu den polaren Aminosäuren Asparagin und Tyrosin mutiert wird. Dieses Verhalten zeigt sich auch beim Einsatz der unpolaren Aminosäuren Glycin, Valin und Isoleucin, die zum Aktivitätsverlust des Enzyms führen. Wie bereits erwähnt, zeigt die Mutante Threonin 135 Leucin einen besonders auffälligen Effekt. Interessanterweise ändert sich sowohl die Substrat- als auch die Produktspezifität des Enzyms. Durch die Homologie-Modellierung der Mutante kann die Wandlung der Benzophenonsynthese zu einer Pyronsynthese (4.2) erläutert werden. Im Modell wird eine neue Bindetasche in der Region neben der  $\beta$ -Position des eingeführten Leucins ersichtlich, die vorher durch die  $\beta$ -Hydroxygruppe des Threonins blockiert ist. Andere Aminosäuren, die weder eine OH-Funktion in  $\beta$ -Position besitzen, noch über ein ausreichendes Raumangebot für eine neue Bindetasche verfügen, führen zum Verlust der Aktivität in den Mutanten T135N, T135Y, T135V und T135I. Auf Grund der Größen und stärkeren Polaritäten von Asparagin und Tyrosin ist es wahrscheinlich, dass diese Aminosäuren nicht wie das Threonin fixiert werden, sondern Wasserstoffbrücken mit anderen Aminosäuren des aktiven Zentrums bilden und so die Bindetasche blockieren. Bei Valin und Isoleucin scheint die Verzweigung in  $\beta$ -Position der Grund zu sein, warum keine neue Tasche ausgebildet werden kann. Kleinere Aminosäuren wie Alanin und Glycin können in den inaktiven Mutanten T135A und T135G die Gesamtstruktur der aktiven Tasche verändern. Offensichtlich besitzt nur die Mutante mit Leucin an dieser Position die nötige Passgenauigkeit zur Bindung eines Phenyl-Substituenten in der neuen Tasche.

In vielen Veröffentlichungen zu pflanzlichen PKS Typ III wird Threonin 135 (Zählweise nach BPS) als entscheidend für die Reaktionsmechanismen beschrieben. Zum Beispiel wird die Aminosäure als wichtiger Stabilisator für intramolekular eingelagertes Wasser im aktiven Zentrum der CHS und STS aufgeführt (Austin et al., 2004). Punktmutationen wurden an dieser Position in den Enzymen aber nur selten durchgeführt. Bei der Umwandlung der

Acridonsynthase von *Ruta graveolens* zur CHS wird Serin an entsprechender Position zu Threonin mutiert (Lukačín et al., 2005). Bei der Umwandlung der CHS von *Medicago sativa* zur STS (18-fach Mutation) wird das Threonin in dieser Position zu Alanin ausgetauscht (Austin et al., 2004). Eine PKS Typ III, die an der Position ein Leucin besitzt, ist die BAS von *Rheum palmatum* (Abe et al., 2001). Veränderungen von PKS in Richtung dieses Enzyms wurden an dieser Position noch nicht vorgenommen. Als Ursache für den Abbruch der Elongation von *p*-Cumaroyl-CoA in der BAS nach einmaliger Verlängerung mit einer C<sub>2</sub>-Einheit aus Malonyl-CoA wird angenommen, dass sich im aktiven Zentrum eine alternative Tasche befindet, in die sich das Diketid einlagern und somit eine weitere Kettenverlängerung unmöglich machen kann (Abe et al., 2007).

Untersuchungen von PKS Typ III beziehen sich auch auf Enzyme, die nicht aus Pflanzen stammen. Es gibt eine kristallisierte und röntgendiffraktometrisch vermessene 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalinsynthase (THNS) aus *Streptomyces coelicolor*, die an der Position 106 (Zählweise nach THNS) ein Cystein besitzt. Diese Aminosäure entspricht der Position 132 in der CHS und der Position 135 in der BPS. Die THNS verwendet als Starter- und Extendersubstrat Malonyl-CoA, von dem fünf Moleküle das Produkt bilden. Nach der Mutation von Cystein 106 zu Serin entsteht als einziges Produkt das Triacetat-Lakton (TAL), welches auch in der 2-PS-Reaktion aus einem Molekül Acetyl-CoA und zwei Molekülen Malonyl-CoA entsteht. Da die THNS dieses Produkt ohne Zugabe von Acetyl-CoA herstellt, muss im Laufe des Reaktionsweges eine Decarboxylierung von Malonyl-CoA zum Acetyl-CoA als Starter stattgefunden haben. Der genaue Zeitpunkt für diese CO<sub>2</sub>-Abspaltung ist allerdings bis heute unklar (Austin et al., 2004).

Wie von Eckermann et al. (1998) erwähnt, akzeptiert 2-PS *in vitro* als Starter-Substrat vorzugsweise Benzoyl-CoA. Dieses Substrat scheint dem Enzym *in vivo* allerdings nicht zur Verfügung zu stehen, da in der Pflanze keine Benzoesäure-Derivate gefunden wurden (Eckermann et al., 1998). Dies steht im Gegensatz zu BPS-führenden Arten der Familien Gentianaceae, Clusiaceae (früher Hypericaceae) und Rosaceae, die im hohen Maße Benzoesäure-abgeleitete Polyketide wie Benzophenone, Xanthone und Biphenyle bilden (Liu et al., 2007). Durch die oben beschriebene Einfachmutation an der Position 135 (T135L) der BPS kann eine Phenylpyrconsynthase hergestellt werden, die im Gegensatz zur 2-PS aus *Gerbera hybrida* keine Affinität zu Acetyl-CoA aufweist. Zur Zeit wird die BPS-Mutante für Transformationsexperimente verwendet, um in transgenen Pflanzen die Bildung von Biphenyl-

Phytoalexinen in Richtung Phenylpyrone umzulenken. Eine ähnliche Strategie ist für die Manipulation des Benzophenon-Stoffwechsels angedacht.

Wie man aus Arbeiten von Cuesta Rubio et al. (1999) und Fuller et al. (1999) weiß, besitzen einige Benzophenonderivate HIV-inhibitorische, plasmodiale und antioxydative Aktivität. Auf der Suche nach potenten Medikamenten gegen HIV fanden Kohl et al. (1988) heraus, dass das HI-Virus inaktiv ist, sobald es die Proteaseaktivität verliert. Auf der Suche nach applizierbaren nicht-peptidischen Protease-Inhibitoren stießen Thaisrivongs et al. (1995) dann auf 2-Pyron-Derivate. Taid et al. (1997) fanden heraus, dass sich 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on-Derivate, die in *para*-Position über eine Thioether-Brücke alkyliert bzw. aryliert sind, *in vitro* kompetente Proteaseinhibitoren darstellen (Abb. 60).

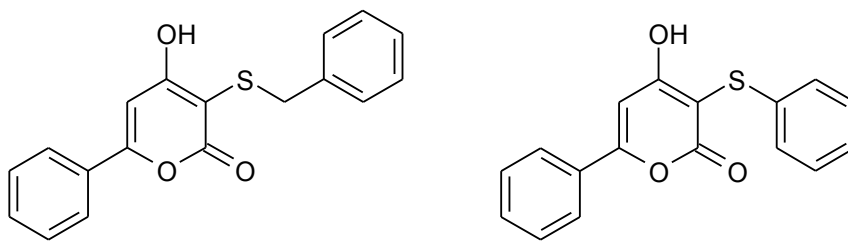


Abbildung 60: 4-Hydroxy-6-phenylpropan-2-on-Derivate; linkes Teilbild mit alkyliertem Thioeter, rechtes Teilbild mit aryliertem Thioether

Bisher werden solche 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-one vor allem als 5,6-Dihydro-4-hydroxy-6-phenylpyran-2-one synthetisch hergestellt (Hagen et al., 1997). Dieses Produkt könnte in transgenen Pflanzen akkumulieren, wenn zum Beispiel *Hypericum spezie*s mit der BPS-Mutante T135L transformiert werden. Durch Isolation des 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-ons könnte der Syntheseprozess wegfallen und eventuell eine schnellere sowie kostengünstigere Produktion der anti-HIV-Medikamente erfolgen.

Wie dargestellt (4.2), ermöglicht die Aminosäuresequenzidentität von PKS Typ III- Vertretern mit ihrem Prototyp-Enzym CHS von 40 – 60 % ein theoretisches Strukturbild mittels Computerprogramm zu entwickeln. Im Fall der BPS sind 59,1 % jedoch nicht ausreichend, um das Verständnis von Substrat- und Produktspezifitäten von einem Enzym auf das andere zu übertragen. Treten messbare Veränderungen durch Mutation bei der Enzymaktivität auf, ist es möglich, diese durch Computermodelle des Wild-Typs und der Mutante differenziell zu erklären. Der umgekehrte Weg vom *in-silico*-Modell zur geplanten Mutante ist auf Grund der hohen Zahl von strukturellen Freiheitsgraden und von möglichen Mutationen in einem Protein

mit den derzeitigen Computermethoden nicht direkt zugänglich. Deshalb ist es wichtig, Computermodelle durch praktische Untersuchungen zu überprüfen und damit zu verifizieren oder wenn nötig zu falsifizieren. Im Fall der Substrat- sowie Produktspezifitätsänderung der BPS Mutante Threonin 135 Leucin ist es gelungen (4.7), Praxis und Theorie in Einklang zu bringen. Rückschlüsse auf den vollständigen Reaktionsablauf in der BPS lassen sich dadurch nicht ziehen, aber ein Teil der in Kapitel 4.6 von den Computerprogrammen berechneten Schritte kann als bestätigt angesehen werden. Die verwendeten Computerprogramme haben die Entstehung einer neuen Tasche, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, als die wahrscheinlichste Möglichkeit postuliert, um die im Labor ermittelten Ergebnisse (4.5) zu erklären.



## 6. Zusammenfassung

### Grundlagen

- ▶ Polyketidsynthasen des Typs III sind Enzyme, die in Pflanzen, Bakterien und Pilzen dafür verantwortlich sind, die Grundgerüste einer Vielzahl von Inhaltsstoffen zu bilden.
- ▶ Die Enzyme leiten sich evolutiv von der ubiquitär vorkommenden Chalkonsynthase ab (Identität auf Aminosäuresequenz-Ebene von mindestens 40 %) und werden darum auch als Chalkonsynthase-verwandte Enzyme bezeichnet.

### Computer- Ergebnisse

- ▶ Auf Grund der Identität von 59,1 % der Benzophenonsynthase aus *Hypericum androsaemum* mit der Chalkonsynthase aus *Medicago sativa* ist es möglich, ein Computermodell der in ihrer Struktur bisher unbekannten Benzophenonsynthase zu erstellen und den Reaktionsablauf in ihr hypothetisch aufzuzeigen.

### Labor-Ergebnisse

- ▶ Durch eine Einfach-Mutation gelingt die Umwandlung des Wild-Typs der Benzophenonsynthase in ein Enzym, das sowohl eine veränderte Substrat- als auch Produktspezifität aufweist.
- ▶ Auf Grund dieser Veränderungen können Rückschlüsse auf den wahrscheinlichen Reaktionsablauf im Enzym gezogen werden.
- ▶ Der von Ferrer et al. (1999) für die Chalkonsynthase postulierte Reaktionsablauf lässt sich auf die Benzophenonsynthase übertragen und kann bis zur Entstehung eines intermediären Triketids nachgewiesen und durch experimentelle Daten belegt werden.
- ▶ Die Entstehung einer neuen kleineren Tasche im aktiven Zentrum der Enzym-Mutante T135L erklärt die Umwandlung der Benzophenonsynthase in eine Phenylpyrconsynthase.
- ▶ Die kinetischen Daten werden für den Wild-Typ der Benzophenonsynthase und die Mutante T135L ermittelt. Der  $K_{cat}/K_m$ -Wert beträgt für den Wild-Typ  $6414 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , bei der Mutante  $6833 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Da die katalytischen Effizienzen ähnlich sind, ist die Benzophenonsynthase erfolgreich in eine funktionale Phenylpyrconsynthase transformiert worden.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abe, T., Morita, H., Noma, H., Kohno, T., Noguchi, H., Abe, I. (2007)** Structure function analysis of benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* in press

**Abe, I., Sano, Y., Takahashi, Y., Noguchi, H. (2003)** Side-directed Mutagenesis of Benzalacetone Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 25218-25226

**Abe, I., Takahashi, Y., Morita, H., Noguchi, H. (2001)** Benzalacetone synthase. A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*. *Eur. J. Biochem.* 268: 3354-3359

**Austin, M. B., Bowmann, M. E., Ferrer, J.-L., Schröder, J., Noel, J. P. (2004)** An Aldol Switch Discovered in Stilbene Synthases Mediates Cyclization Specificity of Type III Polyketide Synthases. *Chemistry & Biology* 11: 1179-1194

**Austin, M. B., Izumikawa, M., Bowmann, M. E., Udway, D. W., Ferrer J.-L., Moore, B. S., Noel, J. P. (2004)** Crystal Structure of a Bacterial Type III Polyketide Synthase and Enzymatic Control of Reactive Polyketide Intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 45162-45174

**Austin, M. B., Noel, J. P. (2003)** The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 20: 79-110

**Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R. A., Swamianathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P. P., Kundu, T. K. (2004)** Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural HAT inhibitor represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J. Biol. Chem.* 279: 33716-33726

**Baumert, A., Maier, W., Gröger, D., Deutzmann, R. (1994)** Purification and properties of acridone synthase from cell suspension cultures of *Ruta graveolens* L. *Z. Naturforsch.*, 49c: 26-32

**Beerhues, L. (1996)** Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaurium erythraea*. *FEBS Lett.* 383: 264-266

**Beerhues, L., Liu, B., Raeth, T., Klundt, T., Beuerle, T., Bocola, M. (2007)** Benzoic acid-specific type III polyketide synthases. *American Chemical Society Symposium Series* 955 (Rimando, A.M., Baerson, S.R., eds.) : 97-108

- Bertram, S., Gassen, H. G. (1991)** Genetische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanweisungen für das molekularbiologische Arbeiten. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*
- Birch, A. J., Donovan, F. W. (1953)** Studies in relation to biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol *Austral. J. Chem.* 6: 360-368
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for scanning of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523
- Borejsza-Wysocki, W., Hrazdina, G. (1996)** Aromatic Polyketide Synthases (Purification, Characterization, and Antibody Development to Benzalacetone Synthase from Raspberry Fruits). *Plant Physiol.* 110: 791-799
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 245-248
- Costa, A. F. (1994)** *Farmacognosia*, vol. II. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp. 1022-1023
- Cuesta Rubio, O., Cuellar, C. A., Rojas, N., Valez Castro, H., Rastrelli, L., Aquino, R. (1999)** A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *J. Nat. Prod.* 62: 1013-1015
- Eckermann, S., Schröder, G., Schmidt, J., Strack, D., Edrada, R. A., Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Kilpeläinen I., Proksch, P., Teeri, T. H., Schröder, J. (1998)** New pathway to polyketides in plants. *Nature* 396: 387-390
- Ferrer, J.-L., Jez, J. M., Bowmann, M. E., Dixon, R. A., Noel, J. P. (1999)** Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature structural biology* 6: 775-784
- Fuller, R. W., Blunt, J. W., Boswell, J. L., Cardellina II, J. H., Boyd, M. R. (1999)** Gutti-ferone F, the First Prenylated Benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii* *J. Nat. Prod.* 62: 130-133
- Hagen, S. E., Prasad, J. V. N. V., Boyer, F. E., Domagala, J. M., Ellsworth, E. L., Gajda, C., Hamilton, H. W., Markoski, L.J., Steinbaugh, B. A., Taid, B. D., Lunney, E. A., Tummino, P. J., Ferguson, D., Hupe, D., Nouhan, C., Gracheck, S. J., Saunders, J. M., VenderRoest, S. (1997)** Synthesis of 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as HIV-1 Protease Inhibitors: The Profound Effect of Polarity on Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* 40: 3707-3711

**Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Griesbach, R. J., Schröder, J., Teeri, T. H. (1995)** Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.* 28: 47-60

**Hu, L. H., Sim, K. Y. (2000)** *Tetrahedron* 56: 1379

**Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R., Miyauchi, K. I. (1996)** Antibacterial activity of xanthenes from Guttiferaeous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 44: 1744-1747

**Jez, J. M., Austin, M. B., Ferrer, J.-L., Bowmann, M. E., Schröder, J., Noel, J. P. (2000)** Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chemistry & Biology* 7: 919-930

**Jez, J. M., Bowmann, M. E., Noel, J. P. (2002)** Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5319-5324

**Kitanov, G. M., Nedialkov, P. T. (2001)** Benzophenone O-glucoside, a biogenic precursor of 1,3,7-trioxygenated xanthenes in *Hypericum annulatum*. *Phytochemistry* 57: 1237-1243

**Klingauf, P., (2004)** Hyperforin-Biosynthese-Molekulare Analyse von Polyketid-Synthasen aus *Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum*. Dissertation Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

**Klingauf, P., Beuerle, T., Mellenthin, A., El-Moghazy, S.A.M., Boubakir, Z., Beerhues, L. (2005)** Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry* 66: 139-145

**Kreuzaler, F., Hahlbrok, K. (1975)** Enzymatic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavon synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochemistry* 56: 205-213

**Kokubun, T., Harborne, J. B. (1994)** A survey of phytoalexin induction in leaves of the Rosaceae by copper ions. *Z. Naturforsch.* 49C: 628-634

**Kokubun, T., Harborne, J. B. (1995)** Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): Biphenyl or dibenzofurans. *Phytochemistry* 40: 1649-1654

- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Liu, B., Beuerle, T., Klundt, T., Beerhues, L. (2004)** Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* 218: 492-496
- Liu, B., Falkenstein-Paul, H., Schmidt, W., Beerhues, L. (2003)** Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and side-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant J.* 34: 847-855
- Liu, B., Raeth, T., Beuerle, T., Beerhues, L. (2007)** Biphenyl Synthase, a Novel Type III Polyketide Synthase. *Planta* 225: 1495-1503
- Lukačín, R., Schreiner, S., Matern, U. (2001)** Transformation of acridone synthase to chalcone synthase. *FEBS Letters* 508: 413-417
- Lukačín, R., Schreiner, S., Silber, K., Matern, U. (2005)** Starter substrate specificities of wild-type and mutant polyketide synthases from Rutaceae. *Phytochemistry* 66: 277-284
- Matsumoto, K., Akao, Y., Kobayashi, E., Ito, T., Ohguchi, K., Tanaka, T., Iinuma, M., Nozawa, Y. (2003)** *Biol. Pharm. Bull.* 26: 569
- Moore, B. S., Hertweck, C. (2002)** *Nat. Prod. Rep.* 19, 70
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M. (2005)** The essential oil composition of *Hypericum androsaemum* L. leaves and flowers from Iran. *Flavour Fragr. J.* 20: 332-334
- Nielsen, H., Arends, P. (1978)** Xanthone constituents of *Hypericum androsaemum*. *Journal of Natural Products* 42: 301-304
- Raeth, T. (2007)** Charakterisierung und Kristallisierung der Biphenylsynthase aus *Sorbus aucuparia*. Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Reif, H. J., Niesbach, U., Deumling, B., Saedler, H. (1985)** Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*. *Molecular and General Genetics* 199: 208-215
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press (2d ed): pp. E.5.
- Schmidt, W., (1997)** Analyse und Biosynthese der Xanthone aus Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* L., Dissertation Universität Bonn

- Schoppner, A., Kindl, H. (1984)** Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J. Biol. Chem.* 259: 6806-6811
- Schröder, G., Brown, J. W., Schröder, J. (1988)** Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur. J. Biochem.* 172: 161-169
- Schröder, J. (1997)** A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. *Trends in plant science* 2: 373-378
- Schulz, V. (2003)** Neue Therapiestudien und Metaanalysen; Johanniskrautextrakte vs. Synthetika. *Pharm. Unserer Zeit* 3: 228-234
- Sielmann, E. H., Creasy, L. L. (1992)** Concentration of phytoalexin resveratrol in wine. *Am J. Enol. Vitic.* 43: 49-52
- Suh, D. Y., Kagami, J., Fukuma, K., Iwanami, N., Yamazaki, Y., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., Shibuya, M., Ebizuka, Y. (2000)** Chalcone and stilbene synthases expressed in eucaryotes exhibit reduced cross-reactivity in vitro. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 48: 1051-1054
- Taid, B. D., Hagen, S., Domagala, J., Ellsworth, E. L., Gajda, C., Hamilton, H. W., Prasad, J. V. N. V., Ferguson, D., Graham, N., Hupe, D., Nouhan, C., Tummino, P. J., Humblet C., Lunney, E. A., Pavlovsky, A., Rubin, J., Gracheck, S. J., Baldwin, E. T., Bhat, T. N., Erickson, J. W., Gulnik, S. V., Liu, B. (1997)** 4-Hydroxy-5,6-dihydropyrones. 2. Potent Non-Peptide Inhibitors of HIV Protease. *J. Med. Chem.* 40: 3781-3792
- Thaisrivongs, S., Watenpaugh, K. D., Howe, W. J., Tomich, P. K., Dolak, L. A., Chong K.-T., Tomich, C.-S. C., Tomasselli, A. G., Turner, S. R., Strohbach, J. W., Mulichak, A. M., Janakiramam, M. N., Moon, J. B., Lynn, J. C., Horng, M.-M., Hinshaw, R. R., Curry, K. A., Rothrock, D. J. (1995)** Structure-Based Design of Novel HIV Protease Inhibitors: Carboxamide-Containing 4-Hydroxycoumarins and 4-Hydroxy-2-pyrones as Potent Nonpeptidic Inhibitors. *J. Med. Chem.* 38: 3624-3637
- Thull, U., Testa, B. (1994)** Screening of unsubstituted cyclic compounds as inhibitors of monoamine oxidases. *Biochemical Pharmacology* 47: 2307-2310
- Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., Schröder, J. (1995)** *J. Biol. Chem.* 270: 7922

**Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schröder, J., Schröder, G. (1994)** Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J. Mol. Evol.* 38: 610-618

**Valentão, P., Carvalho, M., Carvalho, F., Fernandes, E., das Neves, R. P., Pereira, M. L., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L. (2004)** *Hypericum androsaemum* infusion increases *tert*-butyl hydroperoxide-induced mice hepatotoxicity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 345-351

**Valentão, P., Dias, A., Ferreira, M., Silva, B., Andrade, P. B., Bastos, M. L., Seabra, R. M. (2002)** Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. *Natural Product Research*, 17: 135-140

**Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L. (2002)** Antioxidant Activity of *Hypericum androsaemum* Infusion: Scavenging Activity against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1320-1323

**Yamaguchi, T., Kurosaki, F., Suh, D. Y., Sankawa, U., Nishioka, N., Akiyama, T., Shibuya, M., Ebizuka, Y. (1999)** Crossreaktion of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 460: 457-461

**Zhang, S., Yang, X., Morris, M. E. (2004)** Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharm. Res.* 21:1263-1273

**Zuurbier, K. W. M., Leser, J., Berger, T., Hofte, A. J. P., Schröder, G., Verpoorte, R., Schröder, J. (1998)** 4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with nonphysiological substrates. *Phytochemistry* 49: 1945-1951

## 8. Anhang

		10	20	30	40	50	60	
BPS <i>H. a.</i>	MAPAM--EYSTQNGQGEGKKRASVLAIGTTNPEHFILQEDYPDFYFRNTNSEHMTTELKEKFKRICVKSHI	68						
CHS <i>M. s.</i>	M--VSVSE---IRKAQRAEGPATILAIGTANPANCVEQSTYPDFYFKITNSEHKTTELKEKFORMCDKSMI	65						
CHS <i>H. a.</i>	M--VTVEE---VRKAQRAEGPATVMAIGTAVPPNCVDQATYPDYYFRITNSEHKAELKEKFORMCDKSOI	65						
2-PS <i>G. h.</i>	MGSYSSDDVEVIREAGRAQGLATILAIGTATPPNCVAQADYADYYFRVTKSEHMDLKEKFKRICEKTAI	70						
ACS <i>R. g.</i>	M-----ESLKEMRKAQMSEGPAAILAIGTATPDNVFMOADYPDYYFRVTKSEHMTTELKDKFRTLCEKSMI	65						
BIS <i>S. a.</i>	MAP-----LVKNHGEPQHAKILAIGTANPPNVYYQKDYPDFLFRVTKNEHRTDLREKFDRICEKSRT	62						
VPS <i>H. l.</i>	MASVTVEQ---IRKAQRAEGPATILAIGTAVPANCENQADEPDYYFRVTKSEHMTDLKKKFORMCEKSTI	67						
STS <i>P. s.</i>	M--ASIEE---IRNAQRAKGPATILAIGTATPDHCVYQSDYADYYFRVTKSEHMTTELKKKFNRICDKSMI	65						
BAS <i>R. p.</i>	MAT---EEMKKL-----ATVMAIGTANPPNCYYQADEPDFYFRVTNSDHLINLKQKFKRLCENSRI	58						
		70	80	90	100	110	120	130
BPS <i>H. a.</i>	RKRHFYLTTEEILKENQGIATYAGSLDARQRILETEVPKLGQEAALKAIAEWGQPISKITHVVFATTSGF	138						
CHS <i>M. s.</i>	KRRYMYLTTEEILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVVEVPRLGKEAAVKAKEWGQPKSKITHLIVCTTSGV	135						
CHS <i>H. a.</i>	KKRYMYLNEEVILKENPNMCAYMAPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAVKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGV	135						
2-PS <i>G. h.</i>	KKRYLALTEDYLOENPTMCEFMAPSLNARQDLVVTGVPMLGKEAAVKAIDEWGLPKSKITHLIFCTTAGV	140						
ACS <i>R. g.</i>	RKRHMCFSEDFLKANPEVCKHMGKSLNARQDIADVETPRLGNEAALKAKEWGQPKSSITHLIFCASSAGV	135						
BIS <i>S. a.</i>	RKRYLHLTEEILKANPSIYTYGAPSLDVRQDMLNSEVPKLGQQAALKAKEWGQPKSKITHLIFCTASCV	132						
VPS <i>H. l.</i>	KKRYLHLTEEBHLKONPHLCEYNAPSLNTRQDMLVVEVPKLGKEAALNAKEWGQPKSKITHLIFCTGSSI	137						
STS <i>P. s.</i>	KKRYIHLTEEMLEHPNIGAYMAPSLNIRQEIITAEVPKLGKEAALKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGV	135						
BAS <i>R. p.</i>	EKRYLHVTEEILKENPNIAAYEATSLNVRHKMQVKGAELGKEAALKAKEWGQPKSKITHLIVCCLAGV	128						
		140	150	160	170	180	190	200
BPS <i>H. a.</i>	MMPGADYVITRLLGLNRTVRRVMLYNQGCFAGGTALRVAKDLAENNEGARVLVCAENTAMTFHAPNESH	208						
CHS <i>M. s.</i>	DMPGADYQLTKLLGLRPYVKRYMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEVTAVTFRGPSDTH	205						
CHS <i>H. a.</i>	DMPGADYQLTKLLGLRPSVKRMLMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGPTDTH	205						
2-PS <i>G. h.</i>	DMPGADYQLVKLLGLSPSVKRYMLYQQGCAAGGTVLRLAKDLAENNKGSRVLVVCSEITAILFHGPNENH	210						
ACS <i>R. g.</i>	DMPGADYQLTRILGLNPSVKRMMIYQQGQYAGGTVRLAKDLAENNKGSRVLVVCSELTAPTFRGPSDA	205						
BIS <i>S. a.</i>	DMPGADFQLVKLLGLNPSVTRTMIYEAGCYAGATVLRLAKDLAENNEGARVLVCAEITTVFHHGLTDTH	202						
VPS <i>H. l.</i>	DMPGADYQCAKLLGLRPSVKRVMLYQLGQYAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITACIFRGPSSEKH	207						
STS <i>P. s.</i>	EMPGAYYKLANLLGLETSVRRVMLYHQGYAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPSEDA	205						
BAS <i>R. p.</i>	DMPGADYQLTKLLDLDPVSKRFMFYHLGQYAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEMTTTCFRGPSETH	198						



	210	220	230	240	250	260	270	
BPS <i>H. a.</i>	LDVIVGQAMFSDGAAALIIGACPDVASGERAVFNILSASQTIVPGSDGAIHAHFYEMGMSYFLKEDVIPL	278						
CHS <i>M. s.</i>	LDLSLVGQALFGDGAAALIVGSDPVPEI-EKPIFEMVWTAQTIAPDSEGAIDGHLREAGLTFHLLKDVPGI	274						
CHS <i>H. a.</i>	LDLSLVGQALFGDGAAALIIGSDPIPEV-EKPLFELVSAAQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI	274						
2-PS <i>G. h.</i>	LDLSLVAQALFGDGAAALIVGSGPHLAV-ERPIFEIVSTDQITILPDTEKAMKLEHREGGLTFQLHRDVPLM	279						
ACS <i>R. g.</i>	VDLSLVGQALFADGAAALVVGADPDSSI-ERALYYLVASQMLLPDSDGAIEGHIREEGLTVHLKDKVPAL	274						
BIS <i>S. a.</i>	LDILVGQALFADGASAVIVGANPEPKI-ERPLFEIVACRQTIIIPNSEHGVVANIREMGFTYYLSGEVPKE	271						
VPS <i>H. l.</i>	LDCLVGQSLFGDGASSVIVGADPDASVGERPIFELVSAAQTILPNSDGAIAAGHVTEAGLTFHLLRDVPGL	277						
STS <i>P. s.</i>	LDLSLVGQALFGDGSAAVIVGSDPDVSI-ERPLFQLVSAAQTIFIPNSAGAIAGNLREVGLTFHLWPNVPTL	274						
BAS <i>R. p.</i>	LDSMIGQAILGDGAAAVIVGADPDLTV-ERPIFELVSTAQTIVPESHGAIEGHLLESGLSFHLYKTVPTL	267						

	280	290	300	310	320	330	340	
BPS <i>H. a.</i>	FRDNIAAVMEEAFSPLG--VSDWNSLFYSIHPPGGRGIIDGVAGNLGIKDENVATRHVLGEYGNMGSACV	346						
CHS <i>M. s.</i>	VSKNITKALVEAEFPLG--ISDYNISIFWIAHPGGPAILDQVEQKLALKPEKMNATREVLSEYGNMSSACV	342						
CHS <i>H. a.</i>	ISKNVKSLTEAFKPLG--ISDWNLSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLSLKPEKLRATRHVLSEYGNMSSACV	342						
2-PS <i>G. h.</i>	VAKNIENAAEKALSPLG--ITDWNVSFWMVHPGGRAILDQVERKLNKEDKLRASRHVLSEYGNLISACV	347						
ACS <i>R. g.</i>	FSANIDTPLVEAEKPLG--ISDWNISIFWIAHPGGPAILDQIEEKLGLKEDKLRASKHVMSEYGNMSSSCV	342						
BIS <i>S. a.</i>	VGGNVVDFTLKTTEKVDGKNKDWNLSLFFSVHPGGPAIVDQVEEQKLGLKEGKLKLRATRHVLSEYGNMGAPSV	341						
VPS <i>H. l.</i>	ISQNIKSLIEAFTPIG--INDWNISIFWIAHPGGPAILDEIEAKLELKKKMKASREMLSEYGNMSSACV	345						
STS <i>P. s.</i>	ISENIEKCLNQAFDPLG--ISDWNLSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLEKKKLEATRHVLSEYGNMSSACV	342						
BAS <i>R. p.</i>	ISNNIKTCLSDAFTPLN--ISDWNLSLFWIAHPGGPAILDQVTAKVGLKEKELKVTRQVLKDYGNMSSATV	335						

	350	360	370	380	390	
BPS <i>H. a.</i>	MFILDELKRSSKVNKGKPTTGDGKEFGCLIGLGPGLTVEAVVLQSVPIIQ.	396				
CHS <i>M. s.</i>	LFILDEMRKKSSTONGLKTTGEGLEWGVLEFGFGPGLTIVTVLRSVAI	389				
CHS <i>H. a.</i>	LFILDEMRKKSKEGDKLTTGEGLEWGVLEFGFGPGLTVETIVVLSVAI-----N	390				
2-PS <i>G. h.</i>	LFILIDEVRKRSMAGKSTTGEGLDCGVLEFGFGPGMTVETIVVLSVRVTAANGN	402				
ACS <i>R. g.</i>	LFVLDEMRSRSLQDGKSTTGOGLDWGVLEFGFGPGLTVETIVLRSVPIEA	391				
BIS <i>S. a.</i>	HFILDEMRKKSIEEGKSTTGEGLWGVVIGIGPGLTVETAVLRSEIPC	390				
VPS <i>H. l.</i>	FFILDEMRKQSKEGKSTTGDGLEWGALEFGFGPGLTVETIVVLSVPT-N-----V	394				
STS <i>P. s.</i>	LFILDEMRKKSILKGEKATTGDGLDWGVLEFGFGPGLTIVTVVLSVPMVT-----N	392				
BAS <i>R. p.</i>	FFILDEMRKKSLENGQATTGEGLEWGVLEFGFGPGITVETIVVLSVPVIS	384				

Abbildung 61: Abgleich von PKS-Aminosäuresequenzen

BPS *H. a.*: Benzophenonsynthase von *Hypericum androsaemum*; CHS *M. s.*: Chalkonsynthase von *Medicago sativa*; CHS *H. a.*: Chalkonsynthase von *Hypericum androsaemum*; 2-PS *G. h.*: Pyronsynthase von *Gerbera hybrida*; ACS *R. g.*: Acridonsynthase von *Ruta graveolens*; BIS *S. a.*: Biphenylsynthase von *Sorbus aucuparia*; VPS *H. l.*: Valerophenonsynthase von *Humulus lupulus*; STS *P. s.*: Stilbensynthase von *Pinus sylvestris*; BAS *R. p.*: Benzalacetonsynthase von *Rheum palmatum*

Alle in weiß gehaltenen Aminosäuren entsprechen in den jeweiligen Positionen denen der Benzophenonsynthase

ATGGCCCCGGCGATGGAGTACTCAACCCAGAACGGCCAGGGGGAGGGAAAGAAGAGAGCT 60  
TACCGGGGCCGCTACCTCATGAGTTGGGTCTTGCCGGTCCCCCTCCCTTTCTTCTCTCGA  
M A P A M E Y S T Q N G Q G E G K K R A  
AGTGTCCCTCGCTATTGGAACAACCAACCCGGAACATTTTCATCTTGCAGGAGGACTACCCC 120  
TCACAGGAGCGATAACCTTGTTGGTTGGGCCTTGTAAGTAGAACGTCCTCCTGATGGGG  
S V L A I G T T N P E H F I L Q E D Y P  
GACTTCTACTTCAGGAACACCAACAGCGAGCACATGACCGAGCTCAAGGAGAAATTTAAA 180  
CTGAAGATGAAGTCCTTGTTGGTTGTCGCTCGTGTACTGGCTCGAGTTCCTCTTTAAATTT  
D F Y F R N T N S E H M T E L K E K F K  
CGTATCTGTGTTAAGTCTCATATTAGGAAGAGGCACTTCTACCTAACCGAGGAGATTCTC 240  
GCATAGACACAATTCAGAGTATAATCCTTCTCCGTGAAGATGGATTGGCTCCTCTAAGAG  
R I C V K S H I R K R H F Y L T E E I L  
AAGGAGAACCAGGGGATCGCCACCTATGGCGCGGGCTCCCTTGACGCCCGCCAGAGGATC 300  
TTCCTCTTGGTCCCCTAGCGGTGGATAACCGCGCCCGAGGGAACTGCGGGCGGTCTCCTAG  
K E N Q G I A T Y G A G S L D A R Q R I  
CTCGAGACCGAGGTCCCGAAGCTGGGTCAGGAGGCGGCCCTCAAAGCCATCGCGGAGTGG 360  
GAGCTCTGGCTCCAGGGCTTCGACCCAGTCCTCCGCCGGGAGTTTCGGTAGCGCCTCACC  
L E T E V P K L G Q E A A L K A I A E W  
GGCCAGCCCATCTCCAAGATAACACACGTGGTGTTCGCGACGACCTCCGGGTTTCATGATG 420  
CCGGTCGGGTAGAGGTTCTATTGTGTGCACCACAAGCGCTGCTGGAGGCCCAAGTACTAC  
G Q P I S K I T H V V F A T T S G F M M  
CCCGGGGCAGACTACGTCATCACCCGCCTCCTCGGCCTCAACCGCACCGTCAGGCGCGTC 480  
GGGCCCCGTCTGATGCAGTAGTGGGCGGAGGAGCCGGAGTTGGCGTGGCAGTCCGCGCAG  
P G A D Y V I T R L L G L N R T V R R V

ATGCTCTACAACCAGGGCTGCTTCGCTGGGGGCACGGCCCTCCGTGTGCCAAGGACCTC 540  
TACGAGATGTTGGTCCCGACGAAGCGACCCCGTGCCGGGAGGCACAGCGGTTCCTGGAG  
M L Y N Q G C F A G G T A L R V A K D L  
GCGGAGAACAACGAGGGCGCGCGGTGCTCGTCGTGTGCGGGAGAACACCGCCATGACT 600  
CGCCTCTTGTGCTCCCGCGCGCGCACGAGCAGCACACGCGCCTCTTGTGGCGGTACTGA  
A E N N E G A R V L V V C A E N T A M T  
TTCCACGCCCCAACGAGTCCCACCTAGACGTGATCGTGGGGCAAGCCATGTTCTCAGAT 660  
AAGGTGCGGGGGTTGCTCAGGGTGGATCTGCACTAGCACCCCGTTCGGTACAAGAGTCTA  
F H A P N E S H L D V I V G Q A M F S D  
GGCGCGGCTGCTCTGATCATCGGGGCATGCCCTGACGTTGCTTCTGGGGAGCGCGCAGTG 720  
CCGCGCCGACGAGACTAGTAGCCCCGTACGGGACTGCAACGAAGACCCCTCGCGCGTCAC  
G A A A L I I G A C P D V A S G E R A V  
TTCAATATCCTGTGCGCGAGCCAGACGATCGTGCCGGGCTCCGACGGGGCGATAACGGCG 780  
AAGTTATAGGACAGCCGCTCGGTCTGCTAGCACGGCCCGAGGCTGCCCCGCTATTGCCGC  
F N I L S A S Q T I V P G S D G A I T A  
CACTTCTACGAGATGGGGATGAGCTACTTCCTTAAGGAGGACGTCATCCCTCTCTCCGT 840  
GTGAAGATGCTCTACCCCTACTCGATGAAGGAATTCCTCCTGCAGTAGGGAGAGAAGGCA  
H F Y E M G M S Y F L K E D V I P L F R  
GATAACATCGCCGCCGTCATGGAGGAGGCCTTCTCTCCGCTTGGGGTCTCCGACTGGAAC 900  
CTATTGTAGCGGCGGCAGTACCTCCTCCGGAAGAGAGGCGAACCCAGAGGCTGACCTTG  
D N I A A V M E E A F S P L G V S D W N  
TCCCTCTTCTACTCCATCCACCCCGGTGGCCGAGGGATCATCGACGGCGTCGCCGGAAC 960  
AGGGAGAAGATGAGGTAGGTGGGGCCACCGGCTCCCTAGTAGCTGCCGCAGCGGCCCTTG  
S L F Y S I H P G G R G I I D G V A G N

CTTGGGATCAAGGACGAGAACCTTGTGGCGACCAGGCACGTCCTCGGCGAGTACGGGAAC 102  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GAACCCTAGTTCCTGCTCTTGGAACACCGCTGGTCCGTGCAGGAGCCGCTCATGCCCTTG  
L G I K D E N L V A T R H V L G E Y G N  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ATGGGGTCAGCCTGCGTGATGTTTCATCCTTGACGAGCTTAGGAAGAGCTCCAAGGTCAAC 108  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TACCCAGTCGGACGCACTACAAGTAGGAAGTCTCGAATCCTTCTCGAGGTTCCAGTTG  
M G S A C V M F I L D E L R K S S K V N  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GGGAAGCCCACCACCGGCGACGGCAAGGAGTTCGGCTGCCTCATCGGCCTCGGCCCTGGC 114  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CCCTTCGGGTGGTGGCCGCTGCCGTTCTCAAGCCGACGGAGTAGCCGGAGCCGGGACCG  
G K P T T G D G K E F G C L I G L G P G  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CTCACCGTGGAAGCCGTCGTCCTCCAGAGTGTCCCAATTCTCCAGTGA 1188  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GAGTGGCACCTTCGGCAGCAGGAGGTCTCACAGGGTTAAGAGGTCACT  
L T V E A V V L Q S V P I L Q .  
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

Abbildung 62: cDNA-Doppelstrang der Benzophenonsynthase von *Hypericum androsaemum* mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz

## Danksagung

Ich danke herzlichst meinem Mentor Herrn Professor Dr. Ludger Beerhues für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die sehr freundliche Unterstützung sowie das Interesse am Fortgang der Arbeit und die regen Diskussionen zu diesem Thema.

Danken möchte ich Herrn Professor (VRC) Dr. Benye Liu (Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, China) für die praktische Einarbeitung in dieses Thema, die Überlassung der klonierten BPS-cDNA von *H. androsaemum*, die praktische Hilfe im Labor sowie die permanente Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit. Er wurde im Laufe der Zeit zu einem guten Freund.

Meinem Freund, Herrn Dr. Marco Bocola, danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie seine Hilfsbereitschaft beim Erstellen von Bildern zur Homologie-Modellierung. Das gilt auch für seine Überlegungen zur Planung von neuen Mutationsmöglichkeiten an der BPS. Auch gilt mein Dank dem Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim/Ruhr für die Bereitstellung ihrer Computer und deren Software.

Herrn Prof. Dr. T. Hartmann danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Till Beuerle danke ich für die Aufnahme der MS-Spektren sowie die Diskussion dieser Analysen.

Herzlich danken möchte ich Frau Ines Rahaas für die Sequenzierung der mutierten cDNAs.

Meinen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmazeutische Biologie danke ich für die schöne Zeit im Labor und die Diskussionsbereitschaft in Bezug auf diese Arbeit.

Herrn Dr. Kai Klundt danke ich von ganzem Herzen für die unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Alexander Karbstein danke ich für die Rettung meiner Festplatte nach dem Totalabsturz meines Rechners.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich den folgenden Personen:

Cornelia Hüttner, Jörg Hömme, Nelli Eswein, Dr. Michael Graf, Dr. Karsten Klundt, Dr. Kai Klundt sowie Vera Hopfstock.

Allen Freunden und Bekannten danke ich für die Geduld, die sie mir im Laufe dieser Arbeit zukommen ließen.

Ganz besonderer Dank geht an meine Eltern sowie Vera für ihre permanente Unterstützung, ihre Engelsgeduld und Liebe, die sie mir entgegen brachten.